

Aus der Klinik für Urologie und Kinderurologie

Direktor: Prof. Dr. Rainer Hofmann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Analyse der zellulären und löslichen Immuncheckpoint-Komponenten PD-L1 und sPD-L1 beim Nierenzellkarzinom

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des
Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Moritz Justus Philipp Wegner

aus Marburg an der Lahn

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 25.08.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekanin: Frau Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Herr PD Dr. J. Hänze

Korreferent: Herr Prof. Dr. R. Seitz

Meiner Ehefrau und meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	7
2. Abstract	9
3. Hintergrund – Das Nierenzellkarzinom	10
3.1 Epidemiologie	10
3.2 Ätiologie	12
3.3 Pathologie und Pathogenese.....	14
3.3.1 Pathohistologische Klassifikation.....	14
3.3.1.1 Klarzelliges Nierenzellkarzinom.....	15
3.3.1.2 Papilläres Nierenzellkarzinom	15
3.3.2 Molekulare Pathogenese.....	17
3.3.2.1 VEGF-Signalweg.....	17
3.3.2.2 PI3K/AKT/mTOR-Signalweg	18
3.3.2.3 Wnt/ β -Catenin-Signalweg	19
3.3.2.4 HGF/MET-Signalweg.....	19
3.3.2.5 Ras/MAPK-Signalweg.....	20
3.4 Tumormmunologie	21
3.4.1 Krebs-Immunitäts-Zyklus.....	21
3.4.2 CTLA-4	23
3.4.3 PD-1/PD-L1-Signalweg.....	23
3.5 Klinik und Diagnostik.....	25
3.6 Staging	26
3.7 Prognostische Faktoren	27
3.7.1 UICC Stadien.....	27
3.7.2 Tumorgrading und klinische Aspekte.....	29
3.7.3 Molekulare Marker	30
3.8 Therapie	31
3.8.1 Chirurgische Tumorsektion	31
3.8.2 Aktive Überwachung	32
3.8.3 Chemo-, Hormon- und Radiotherapie	32
3.8.4 Adjuvante Therapiemaßnahmen.....	32
3.8.5 Molekulare zielgerichtete Therapie	33
3.8.5.1 Antiangiogenetische Therapie (VEGF-Signalweg-Inhibitoren)	33
3.8.5.2 mTOR-Signalweg-Inhibitoren	36
3.8.6 Immuntherapie.....	37
3.8.6.1 Interferon- α	37

3.8.6.2 Interleukin-2.....	37
3.8.6.3 Immuncheckpoint-Inhibitoren	38
3.8.7 Therapieentscheidungen bei Patienten in fortgeschrittenem Erkrankungsstadium	38
3.8.7.1 Initiale Therapie bei niedrigem Risiko.....	38
3.8.7.2 Initiale Therapie bei mittlerem oder hohem Risiko	40
3.8.7.3 Therapieentscheidung nach Beendigung der initialen Therapie	40
4. Zielsetzung	41
5. Material und Methoden	42
5.1 Material	42
5.2 Methoden	49
5.2.1 Zellkultur	49
5.2.1.1 Verwendete Zelllinien.....	49
5.2.1.2 Allgemeine Kulturbedingungen.....	50
5.2.1.2 Passagieren der Zellen	50
5.2.1.3 Behandlung der Zellen mit Interferon- γ , Interleukin-2 und Interleukin-6	51
5.2.1.4 RNA-Interferenz mittels siRNA	51
5.2.2 Quantitative real-time PCR.....	52
5.2.2.1 RNA-Isolation.....	52
5.2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	53
5.2.2.3 Reverse Transkription der mRNA in cDNA	54
5.2.2.4 Durchführung der PCR	55
5.2.2.5 Auswertung der Ergebnisse	57
5.2.3 Western Blot.....	57
5.2.3.1 Proteinisolation mit TriFast	58
5.2.3.2 Proteinisolation mit RIPA.....	58
5.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	59
5.2.3.4 Gelelektrophorese	60
5.2.3.5 Immunoblot.....	61
5.2.4 sPD-L1 ELISA und Gewinnung von PD-L1-mRNA aus Blutproben	62
5.2.4.1 Probengewinnung aus den Zellkulturüberständen	62
5.2.4.2 Probengewinnung aus Patientenblut	62
5.2.4.3 Durchführung des ELISA	64
5.2.4.4 Auswertung der Ergebnisse	64
6. Ergebnisse	65
6.1 Regulation von PD-L1 in RCC-Zelllinien	65
6.2 Etablierung des <i>knock-downs</i> von PD-L1 durch siRNA bei CaKi-1-Zellen: Effekte auf PD-L1 und sPD-L1	67
6.3 Konstitutive und induzierbare Expression von PD-L1 bei CaKi-1- und CaKi-2-Zellen	68
6.4 Nachweis von sPD-L1 im Blut von RCC-Patienten prä-post Tumorresektion.....	69

6.5 Interleukin-6 bei CaKi-1- und HepG ₂ -Zellen.....	71
7. Diskussion	73
7.1 IFN- γ -abhängige Induktion von PD-L1 bei RCC-Zelllinien	74
7.2 Nachweis von sPD-L1 aus Zellkulturüberständen	76
7.3 Bestimmung von PD-L1 mRNA und sPD-L1 aus Patientenblutproben	78
7.4 Forschungsausblick.....	80
8. Literaturverzeichnis.....	81
9. Abkürzungsverzeichnis.....	107
10. Abbildungsverzeichnis	111
11. Tabellenverzeichnis.....	112
12. Anhang	113
I. Lebenslauf	113
II. Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	114
III. Danksagung.....	115
IV. Ehrenwörtliche Erklärung.....	116

1. Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom (RCC) zählt in Deutschland zu den zehn am häufigsten vorkommenden Tumor-entitäten. Während bei lokal begrenzten Tumoren eine operative Tumorresektion mit kurativer Zielsetzung möglich ist, führt es im metastasierten Erkrankungsstadium unbehandelt binnen weniger Wochen zum Tod. Durch die Einführung der medikamentösen Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren (z.B. Pembrolizumab, anti-PD-1-Antikörper oder Avelumab, anti-PD-L1-Antikörper), die gegen spezifische co-inhibitorische Rezeptoren auf Tumor- (PD-L1; engl.: programmed death ligand) oder Immunzellebene (PD-1; engl.: programmed death) gerichtet sind, konnte die Lebenserwartung der Patienten in diesem Stadium deutlich verlängert werden. Dabei profitiert ein Teil der Patienten jedoch nicht von der Therapie oder erleidet schwerwiegende immunvermittelte Nebenwirkungen. Verlässliche prädiktive Biomarker für die Klinik wären in diesem Zusammenhang hilfreich.

In dieser Arbeit wurde die Expression und die Regulation von PD-L1 durch Zytokine an verschiedenen Zelllinien des Nierenzellkarzinoms untersucht und überprüft, inwieweit die lösliche Form von PD-L1 (sPD-L1) von den Zellen in den Zellüberstand abgegeben wird. Ergänzend wurde sPD-L1 im Serum von Patienten mit Nierentumor vor und nach Tumorresektion gemessen. An klarzelligen RCC Zelllinien (A498, CaKi-1, Cal54) zeigte sich die typische Induktion von PD-L1 durch Interferon- γ (IFN- γ). Diese ging mit einem Anstieg von sPD-L1 im Zellüberstand einher. *Knock-down* von PD-L1 durch siRNA (engl.: small interfering ribonucleic acid) führte zu einer Herabregulation von PD-L1, die von einem Abfall von sPD-L1 im korrespondierenden Zellüberstand begleitet war, was darauf hindeutet, dass RCC Zellen auch sPD-L1 sezernieren. An der untersuchten papillären RCC-Zelllinie (CaKi-2) zeigte sich eine konstitutive Expression von PD-L1, jedoch keine Induktion durch IFN- γ . Diese Daten weisen darauf hin, dass die Expression und Regulation von PD-L1 mit Einfluss auf sezerniertes sPD-L1 an Zellen des Nierenzellkarzinoms unterschiedlich ist.

Im Blut von Patienten mit RCC wurden heterogene Konzentrationen von sPD-L1 nachgewiesen. Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter Anstieg von sPD-L1 nach Tumorresektion im Vergleich zu den „gepaarten“ Blutwerten vor Tumorresektion, was auf einen primär nicht vom Tumor abgeleiteten Ursprung von sPD-L1 im Blut hinweist. Weitere Analysen zeigten eine signifikante Korrelation von sPD-L1 mit dem Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP). Ebenso wie sPD-L1 war dabei CRP erwartungsgemäß, bedingt durch den chirurgischen Eingriff, in den post- versus prä-Tumorresektions-Proben erhöht. Ferner zeigt sich eine Korrelation von sPD-L1 im Serum mit PD-L1-mRNA gemessen im Vollblut.

Für die mögliche klinische Bedeutung dieser Daten lassen sich folgende Aspekte ableiten: Die IFN- γ -abhängige Regulation von PD-L1 an RCC Zellen könnte eine Bedeutung für die Responsivität der Patienten gegenüber einer Therapie mittels Immuncheckpoint-Blockade (ICB) haben und sich bei klarzelligem RCC und papillärem RCC unterscheiden. Diese Hypothese könnte an entsprechenden Patientenkohorten perspektivisch untersucht werden. Die Blutwerte von sPD-L1 setzen sich möglicherweise aus sPD-L1 abgegeben von Tumorzellen zum einen und sPD-L1 gebildet in Immunzellen zum

anderen zusammen. Die Bedeutung von sPD-L1 als Biomarker für eine ICB-Therapie ist daher komplex und bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen von sPD-L1 an verschiedenen Patientenkohorten, die sich beispielsweise anhand ihrer Entzündungsparameter unterscheiden.

2. Abstract

Renal cell carcinoma (RCC) is one of the ten most common cancers in Germany. Whilst tumors localized within the kidney may be successfully treated by surgical tumor resection, untreated metastatic disease leads to death within a few weeks. The introduction of drug therapy using immune checkpoint inhibitors (e.g. Pembrolizumab, anti-PD-1-antibody or Avelumab, anti-PD-L1-antibody), which target specific co-inhibitory receptors at the tumor (PD-L1) or immune cell (PD-1) levels, has significantly increased the life expectancy of these patients. However, a significant number of patients do not benefit from this therapy or suffer serious immune-related adverse events, hence finding reliable predictive biomarkers would be of crucial importance for choosing the right therapeutic agent.

In this study, the expression and regulation of PD-L1 by cytokines was investigated in different cell lines of RCC and the amount of soluble PD-L1 (sPD-L1) released from the cells into the cell supernatant was measured. In addition, the levels of sPD-L1 were measured in the serum of patients with renal tumors before and after tumor resection. In the clear cell RCC cell lines (A498, CaKi-1, Cal54), the typical induction of PD-L1 by Interferon- γ (IFN- γ) was found, with an increase of sPD-L1 levels in the cell supernatant. *Knock-down* of PD-L1 by siRNA resulted in the downregulation of PD-L1, and a decrease in sPD-L1 levels in the corresponding cell supernatant, suggesting that ccRCC cells secrete sPD-L1. In the papillary RCC cell line (CaKi-2), PD-L1 could be measured but there was no increase in IFN- γ . This data indicates that the expression and regulation of PD-L1 as measured by secreted sPD-L1 may vary in different types of RCC cells.

Heterogeneous levels of sPD-L1 were detected in the blood of patients with RCC. Interestingly, there was a significant increase in sPD-L1 after tumor resection compared with paired blood levels before tumor resection, indicating a primarily non-tumor derived origin of sPD-L1 in blood. Further analysis showed a significant correlation of sPD-L1 with the inflammatory marker C-reactive protein (CRP). Like sPD-L1, CRP was elevated in the post- versus pre-tumor resection samples, as expected due to the surgical insult. Furthermore, there was a correlation of sPD-L1 in serum with PD-L1 mRNA measured in whole blood.

These results indicate that IFN- γ dependent regulation of PD-L1 in RCC cells may be an important factor in the responsiveness of patients towards immune checkpoint blockade (ICB) therapy and that there may be differences between ccRCC and pRCC cell lines. This hypothesis needs to be further investigated using appropriate patient cohorts. The sPD-L1 levels measured in blood may consist of sPD-L1 released from tumor cells and of sPD-L1 formed in immune cells. The significance of sPD-L1 as a biomarker for ICB therapy is therefore complex and requires further investigation using different patient cohorts with a range of inflammatory parameters.

3. Hintergrund – Das Nierenzellkarzinom

3.1 Epidemiologie

Das Nierenzellkarzinom (RCC, engl.: renal cell carcinoma) wird zu den Adenokarzinomen gezählt und stellt mit fast 90% die häufigste der primär renalen Neoplasien dar (Robert-Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019). Es repräsentiert weltweit ca. 2-3% aller Krebserkrankungen, wobei die Inzidenz stark zwischen verschiedenen geographischen Regionen und unterschiedlichen Populationen variiert. Sie ist in Westeuropa und Nordamerika am höchsten (Lindblad, 2004). In der Europäischen Union lag die Inzidenz im Jahre 2012 annähernd bei 84.400 Fällen, in Deutschland lag sie bei knapp 15.000 Fällen. An einem RCC verstarben in der Europäischen Union im Jahr 2012 etwa 34.700 Patienten. Das mittlere Erkrankungsalter liegt beim Mann bei 68 Jahren und bei der Frau bei 72 Jahren (Robert-Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019), wobei Männer etwa doppelt so häufig erkranken wie Frauen (Ferlay et al., 2013).

In der Regel erkranken Patienten zwischen dem 60. und dem 80. Lebensjahr (Thompson et al., 2008), Erkrankungen vor dem 40. Lebensjahr sind deutlich seltener (Siemer et al., 2006). Am seltensten erkranken Kinder an einem RCC (Cook et al., 2006). Die Inzidenzrate zeigte in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts einen starken Anstieg. So wuchs sie in den USA zwischen 1975 und 1995 jährlich um 2,3% bis 4,3% an. Dieser Anstieg hängt zu einem gewissen Teil mit dem breiteren und häufigeren Einsatz bildgebender Verfahren wie Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und Ultraschalluntersuchungen (US) zusammen (Chow et al., 1999), wodurch viele RCCs als Zufallsbefund entdeckt werden. Während 1973 nur ungefähr 10% aller RCCs als inzidentelle Karzinome diagnostiziert wurden, waren es 1999 schon bis zu 60% (Touloupidis et al., 2006). Inzidentell diagnostizierte RCCs wiesen bei Diagnosestellung meist ein niedrigeres Tumorstadium, ein niedrigeres Tumorgading und geringere Metastasierungsraten auf (Luciani et al., 2000). Zudem nahm die durchschnittliche Größe eines RCCs bei Diagnosestellung in den letzten Jahren deutlich ab. So betrug sie im Stadium I im Jahr 1993 noch 4,1 cm und verringerte sich bis zum Jahr 2003 auf durchschnittlich 3,6 cm (Kane et al., 2008). Diese frühere Diagnosestellung konnte sich jedoch noch nicht in verminderten Absterberaten niederschlagen, zumindest nicht in Bezug auf die Gesamtmortalität von Patienten mit RCC. So stieg diese in den USA von 1,5/100.000 in 1983 auf 6,5/100.000 Einwohner in 2002 an. Darüber, ob diese vermehrt diagnostizierten asymptomatischen RCCs klinische Relevanz besitzen, herrscht aktuell noch Unklarheit (Hollingsworth et al., 2006).

Die altersstandardisierten Sterberaten liegen in Deutschland für Männer bei 5,1/100.000 und für Frauen bei 2,4/100.000 Einwohner. Die 5-Jahres-Überlebensrate des RCC beträgt über alle Stadien hinweg in Deutschland 76% bei Männern und 78% bei Frauen (Robert-Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019). In den USA lag sie im Jahr 2016 bei 93% im lokalisierten Erkrankungsstadium, bei 70% im Falle regionalen Lymphknotenbefalls und bei 12%, sofern bei Diagnosestellung bereits Fernmetastasen vorhanden waren (Abb. 1). Das Tumorstadium bei

Diagnosestellung ist maßgeblich entscheidend für die 5-Jahres-Überlebensrate, da in fortgeschrittenen Stadien keine kurativen Therapiemöglichkeiten existieren. Zu diesem Zeitpunkt präsentieren sich in den USA 65% der Patienten im Stadium der lokalisierten Erkrankung, 16% mit lokaler Lymphknoteninvasion und 16% im metastasierten Erkrankungsstadium, 3% verbleiben in einem unbestimmten Stadium (Abb. 2, National Cancer Institute, 2016).

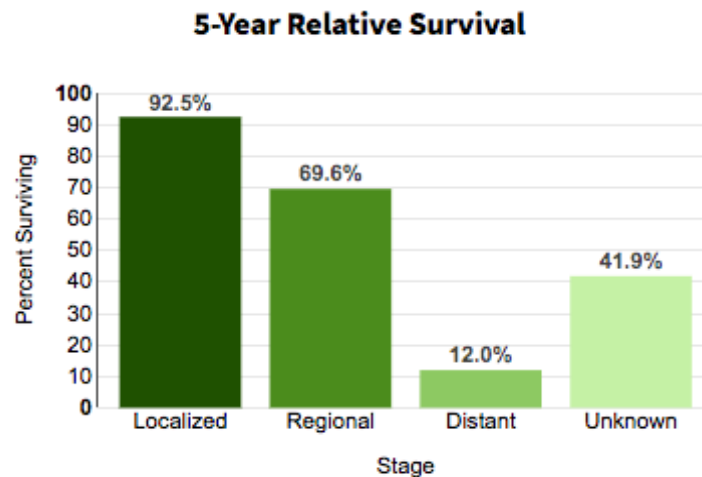


Abbildung 1: 5-Jahresmortalität in Bezug auf das Krankheitsstadium bei Diagnosestellung in den USA 2010-2016 (National Cancer Institute, 2016)

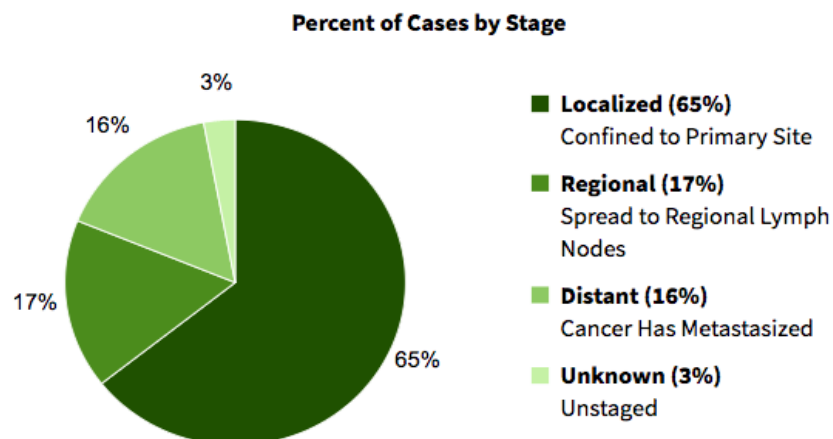


Abbildung 2: Krankheitsstadium bei Diagnosestellung in den USA 2010-2016 (National Cancer Institute, 2016)

3.2 Ätiologie

Es existieren diverse Risikofaktoren, welche die Auftretenswahrscheinlichkeit eines RCC erhöhen. Als gesichert gilt, dass sich für Raucher das relative Risiko, an einem RCC zu erkranken, signifikant erhöht. Das relative Risiko (RR) für das Auftreten eines RCC für Raucher generell liegt bei 1,31, bei aktuell noch rauchenden Personen bei 1,36 und bei Personen, die das Rauchen in der Vergangenheit aufgegeben hatten, bei 1,16 (Cumberbatch et al., 2016). Zudem konnte gezeigt werden, dass gesteigerter Tabakkonsum mit einem erhöhten Risiko für ein bereits bei Diagnosestellung fortgeschrittenes Krankheitsstadium assoziiert ist (Tsivian et al., 2011).

Weitere Risikofaktoren sind Adipositas, arterielle Hypertonie und der länger andauernde Gebrauch nichtsteroidaler Antiphlogistika (Setiawan et al., 2007; Cho et al., 2011). In Bezug auf Adipositas konnte in einer prospektiven Studie mit über 300.000 Patienten gezeigt werden, dass sich das RR für das Auftreten eines RCC progressiv mit dem Ausgangs-BMI (engl.: body mass index) erhöhte (Adams et al., 2008). Gleichzeitig zeigte sich jedoch ein paradoxer Effekt, denn während deutlich mehr Patienten mit Adipositas an einem RCC erkranken, nahm die Schwere der Erkrankung bei adipösen Patienten signifikant ab. So konnte der präoperative BMI als unabhängiger prognostischer Faktor für ein verlängertes Überleben bei Patienten, welche sich einer Tumoresektion unterzogen, identifiziert werden (Choi et al., 2013). Dies gelang auch für einen generell erhöhten BMI, welcher einen unabhängigen prognostischen Faktor für ein verlängertes Überleben und für das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit bereits metastasierter Erkrankung, welche eine gezielte Krebstherapie (TT, engl.: targeted therapy) erhielten, darstellte (Albiges et al., 2016). Als mögliche Ursache hierfür wird vermutet, dass sich die Mikroumgebung des Tumors bei adipösen Patienten im Vergleich zu schlanken Patienten unterscheidet (Sanchez et al., 2020). Möglicherweise könnte auch eine verminderte Expression des FASN-Gens (engl.: fatty acid synthase) hierbei eine Rolle spielen (Albiges et al., 2016).

Auch die längerfristige, insbesondere berufliche, Exposition gegenüber bestimmten Toxinen wie Cadmium, Asbest und Erdöl oder Produkten, die aus Erdöl hergestellt wurden, scheint für ein RCC zu prädisponieren (Mandel et al., 1995). Die metachrone Auftretenswahrscheinlichkeit eines bilateralen RCC ist zudem für Patienten, die bereits in relativ jungem Alter erkranken oder eine multifokale Erkrankung haben, stark erhöht (Wiklund et al., 2009; Gnarra et al., 1993). Bei Patienten mit einer chronischen, dialysepflichtigen Nierenerkrankung stellt die erworbene zystische Nierenerkrankung als Ursache der Niereninsuffizienz einen starken Risikofaktor für die Entwicklung eines RCC dar (Truong et al., 1995). Zudem ist die chronische Infektion mit dem Hepatitis-C Virus mit einem signifikant erhöhten Risiko assoziiert, an einem RCC zu erkranken (Gordon et al., 2010).

Weiterhin scheint die Anwendung von zytotoxischer Chemotherapie in der Kindheit und Jugend bei Tumorerkrankungen, Autoimmunerkrankungen oder zur Vorbereitung auf eine Knochenmarkstransplantation für die Entstehung eines Translokations-RCC zu prädisponieren (Argani et al., 2016). Ebenfalls diskutiert wird die These, dass ein Nierensteinleiden in der Krankheitsgeschichte mit dem Auftreten von RCCs oder Urothelkarzinomen des oberen Harntraktes assoziiert ist, was aber gleichermaßen durch

die Tatsache mitbegründet sein könnte, dass auf Grund des vermehrten Einsatzes von bildgebenden Verfahren zur Steindetektion lediglich mehr Malignitäten diagnostiziert werden (Cheungpasitporn et al., 2015). Diesen zahlreichen Risikofaktoren gegenüberstehend scheinen körperliche Aktivität und moderater Alkoholkonsum einen protektiven Effekt auf die Entwicklung eines RCC zu haben (Setiawan et al., 2007).

Eine familiäre Häufung des RCC spielt eine eher untergeordnete Rolle (2-3%), auch wenn das relative Risiko für erstgradig Verwandte von Betroffenen, ebenfalls an einem RCC zu erkranken, nahezu verdoppelt ist (Pavlovich & Schmidt, 2004). Es existieren diverse, zumeist autosomal-dominant vererbte, hereditäre Syndrome, welche mit dem vermehrten Auftreten von RCCs assoziiert sind (Tab. 1). Ihnen liegen unterschiedliche Chromosomenaberrationen zugrunde, deren Untersuchung maßgeblich zum Verständnis der molekularen Tumorphagenese und den daraus abgeleiteten Behandlungsstrategien beigetragen hat (Zbar et al., 2003).

Hierzu zählen unter anderen das Bourneville-Pringle-Syndrom, das Birt-Hogg-Dubé-Syndrom (BHD-Syndrom), das hereditäre papilläre RCC, das hereditäre Leiomyomatosis RCC und als relevantestes Syndrom das Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL-Syndrom; Verine et al., 2010). Letzteres ist durch eine Mutation auf dem für ein Tumorsuppressorprotein kodierenden VHL-Gen auf Chromosom 3 charakterisiert, welche im Falle der Mutation beider Gene zur Tumorentstehung führt. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten eines RCC bei VHL-Patienten beträgt 25-70%, zudem treten die Tumore bereits in einem jüngeren Lebensalter, multilokulär und in Kombination mit Veränderungen an weiteren Organsystemen wie dem zentralen Nervensystem (ZNS) auf (Coleman & Russo, 2009).

Tabelle 1: Mit dem RCC assoziierte vererbte Erkrankungen (Rübben, 2014)

Syndrom	Gene	Klinische Manifestation
VHL-Syndrom	VHL (3p25-26)	klarzelliges RCC; Hämangioblastome des ZNS, Phäochromozytome, endokrine Tumoren des Pankreas, Paragangliome, retinale Angiomatose
Hereditäres papilläres RCC	C-Met-Proto-Onkogen (7q31-34)	papilläres RCC Typ 1 – meist multifokal, bilateral
Hereditäre Leiomyomatose mit RCC	Fumarat-Hydratase (1q42-43)	papilläres RCC Typ 2, uterine und kutane Leiomyome, Leiomyosarkome des Uterus, mögliche Assoziation mit Brust- und Harnblasenkarzinom
Birt-Hogg-Dubé-Syndrom	BHD1 (17p11)	chromophobes RCC, Onkozytom (benigne), Lungenzysten oder Pneumothorax, kutane Fibrofolliculome

Tuberöse Sklerose (Bourneville-Pringle-Syndrom)	TSC1 (9q34) oder TSC2 (16p13)	multiple renale Angiomyolipome, RCC, Nierenzysten und/oder Zystennieren, kardiale Rhabdomyome, Hauttumore wie Angiofibrome, Fibrome und Nävi, mentale Retardierung, Epilepsie
--	-------------------------------------	---

3.3 Pathologie und Pathogenese

3.3.1 Pathohistologische Klassifikation

In über 85% der Fälle handelt es sich bei primär malignen Neoplasien der Niere um ein RCC, weniger häufig sind Urothelkarzinome des Nierenbeckens, Lymphome oder Sarkome der Niere, sowie Nephroblastome, die auch als Wilms-Tumore bezeichnet werden und im Kindesalter auftreten (Robert-Koch-Institut & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2019). Histologisch teilt man das RCC in verschiedene Subtypen ein (Tab. 2), wobei das klarzellige RCC (ccRCC, engl.: clear cell RCC) den größten Anteil ausmacht (75-85%), gefolgt vom papillären RCC (pRCC, engl.: papillary RCC), welches auch als chromophiles RCC bezeichnet wird, mit (10-15%). Darauf folgen die chromophoben RCCs (5-10%), die seltener auftretenden benignen Onkozytome (3-5%) und die sehr seltenen Sammelrohr- oder auch Ductus-Bellini-Karzinome (<1%; Störkel et al., 1997). Sie ähneln auf molekularer Ebene einem weiteren seltenen Subtypen, den sogenannten Translokations-RCCs. Diese Translokations-RCCs treten in deutlich jüngerem Alter auf und weisen eine Fusion des Transkriptionsfaktors E3 (TFE3) mit diversen anderen Genen, unter anderem mit dem ASPSCR1-Gen (engl.: alveolar soft part sarcoma chromosome region 1), auf (Malouf et al., 2011).

Undifferenzierte Karzinome treten in etwa 4-5% der Fälle auf und haben eine deutlich schlechtere Prognose (Störkel et al., 1997). Charakteristiken der beiden häufigsten histologischen Subtypen, dem ccRCC und dem pRCC, werden nachstehend genauer betrachtet.

Tabelle 2: Histologische Subtypen des RCC und ihre Kennzeichen (Störkel et al., 1997; Wolf, 2012)

Histologischer Typ	Häufigkeit	Kennzeichen
Klarzelliges RCC	75-85%	hoher Glykogen- und Lipidgehalt, helles Zytoplasma, solides bis zystisches Wachstumsmuster, Differenzierungsmerkmale der proximalen Tubuluszellen
Papilläres (chromophiles) RCC	10-15%	häufig multiples Auftreten, makroskopisch Nekrosen erkennbar, histologisch papilläres und tubuläres Wachstum, Differenzierungsmerkmale der proximalen Tubuluszellen
Chromophobes RCC	5-10%	feingranuläres nicht transparentes Zytoplasma, solides Wachstumsmuster, Differenzierungsmerkmale des distalen Tubulussystems

Ductus-Bellini-/Sammelrohr-Karzinom	<1%	tubuläre Strukturen, ausgeprägte Desmoplasie des Tumorstromas, sarkomatoide Anteile mit Spindelzellen
Unklassifiziertes RCC	4-5%	

3.3.1.1 Klarzelliges Nierenzellkarzinom

Klarzellige RCCs haben ihren Ursprung in den Zellen des proximalen Tubulusepithels. Erste Einsichten in die molekulare Pathogenese des RCC gelangen durch Studien des oben beschriebenen VHL-Syndroms. Genetische Analysen von VHL-assoziierten RCCs konnten einen Verlust der Heterozygotie (LOH, engl.: loss of heterozygosity) am VHL-Genort auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (Genort: 3p25) nachweisen, welcher ebenfalls bei 60-70% der sporadischen ccRCCs auftritt (van Houwelingen et al., 2005).

In einer 2011 durchgeführten Exomsequenzierung von 227 Fällen von ccRCC zeigte sich eine Mutation des SWI/SNF-Komplex-Gens (engl.: switch/sucrose nonfermentable chromatin remodeling complex) PBRM1 (engl.: protein polybromo 1) in 41% der Fälle (Varela et al., 2011). Dieses Gen ist auf Chromosom 3 in der Nähe des VHL-Gens (Genort: 3p21) lokalisiert und fungiert als Tumorsuppressorgen. Weiterhin konnte 2012 eine Inaktivierung der vom BAP1-Gen (engl.: breast-cancer antigen 1 associated protein 1) kodierten nukleären Deubiquitinase in ca. 15% der untersuchten ccRCCs nachgewiesen werden (Peña-Llopis et al., 2012). Tumore, die Mutationen dieses BAP1-Gens aufwiesen, zeigten ein aggressiveres Wachstum und eine Assoziation mit erhöhter Sterblichkeit (Kapur et al., 2013). Diese Gene kodieren für Proteine, die Teil des UMP-Signalwegs sind (UMPP, engl.: Ubiquitin-mediated proteolysis pathway), welcher eine wichtige Rolle im Proteinabbau durch das Proteasom spielt. Veränderungen in diesem Signalweg führen zu Hypoxie in der Zelle, was in ähnlichen funktionellen Konsequenzen resultiert wie die Inaktivierung des VHL-Gens (Guo et al., 2011).

Zudem scheinen Alterationen in Genen, welche die Zellteilung kontrollieren, die Auftretenswahrscheinlichkeit eines ccRCC zu erhöhen. Hierzu zählen die Gene der Ras-Familie (engl.: rat sarcoma) sowie das p53-Tumorsuppressorgen. Während Mutationen im p53-Gen nur vereinzelt in ccRCCs nachgewiesen werden konnten, zeigte sich eine Überexpression des p53-Proteins in etwa 50% der ccRCCs, welche gleichermaßen mit einem aggressiveren Tumorwachstum und einer schlechteren Prognose verbunden war (Uhlman et al., 1994).

3.3.1.2 Papilläres Nierenzellkarzinom

Papilläre Nierenzellkarzinome stellen die zweithäufigste Form des RCCs dar. Sie werden basierend auf histopathologischen Gesichtspunkten in Typ 1 und Typ 2 unterteilt. Ebenso wie das ccRCC entstehen pRCCs aus den Zellen des proximalen Tubulusepithels, stellen aber aus morphologischen und genetischen

schen Gesichtspunkten heraus unterschiedliche Erkrankungen dar. Frühe Erkenntnisse über die molekulare Pathogenese des pRCC wurden aus Fallstudien hereditärer Formen des RCC gewonnen, dem hereditären papillären RCC (Zbar et al., 1994).

Obwohl Typ 1 pRCCs für diese vererblichen Erkrankungsform, welche durch genetische Veränderungen im c-MET-Protoonkogen Signalweg (engl.: cellular N-methyl-N'-nitroso-guanidine human osteosarcoma transforming gene) gekennzeichnet ist, charakteristisch sind, tritt der Großteil der Typ 1 Karzinome sporadisch auf. Sporadische Typ 1 Karzinome zeigten somatische Mutationen dieses Signalwegs lediglich in 10-20% der Fälle (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2016). Fälle mit Typ 1 pRCCs fallen vermehrt in früheren Tumorstadien auf und gehen mit einer relativ guten Prognose einher (Thoenes et al., 1988).

C-Met, kodiert durch das c-Met-Protoonkogen auf Chromosom 7, ist eine Rezeptortyrosinkinase, welche durch Bindung an den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF, engl.: hepatocyte growth factor) verschiedene Signalwege induziert, die für die Steuerung der Zellmigration und -proliferation verantwortlich sind (Harshman & Choueiri, 2013). Insgesamt traten Veränderungen dieses Signalwegs, definiert als Mutation, Splicing-Variante oder Genfusion, sowie eine erhöhte Kopienanzahl von Chromosom 7 in über 40% der Typ 1 pRCCs auf (Choueiri, Plimack et al., 2017), in manchen Studien sogar in einem noch höheren Anteil (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2016).

Diesen Typ 1 Tumoren stehen die Typ 2 pRCCs gegenüber, welche vermehrt mit aggressiven Verläufen assoziiert sind. Sie werden häufiger in bereits fortgeschrittenen Tumorstadien diagnostiziert und gehen mit schlechteren Prognosen einher (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2016). Wie beim ccRCC und dem Typ 1 pRCC wurde der heutige Wissenstand über Typ 2 pRCCs maßgeblich durch Studien von vererblichen Erkrankungsformen, in diesem Fall der hereditären Leiomyomatose mit Nierenzellkarzinom, geprägt (Grubb et al., 2007). Dieses Syndrom wird durch eine Keimbahnmutation des für die Fumarat-Hydratase, eines zentralen Enzyms des Citratzyklus, kodierenden Gens ausgelöst (Tomlinson et al., 2002). Die entstehenden Tumore sind durch erhöhten oxidativen Stress gekennzeichnet (Sudarshan et al., 2009). Die daraus resultierende Aktivierung des NRF2-ARE-Signalwegs (engl.: nuclear factor erythroid 2 - related factor 2 - antioxidant response element) konnte ebenfalls bei sporadischen Typ 2 pRCCs nachgewiesen werden (Ooi et al., 2011, 2013).

Chromosomale Aberrationen des Chromosoms 8, Überexpression des MYC-Protoonkogens (Genort: 8q24, abgeleitet von „Myelocytomatose“) und Aktivierung des MYC-Signalwegs sind weitere Merkmale von besonders aggressiven pRCCs (Furge et al., 2007).

3.3.2 Molekulare Pathogenese

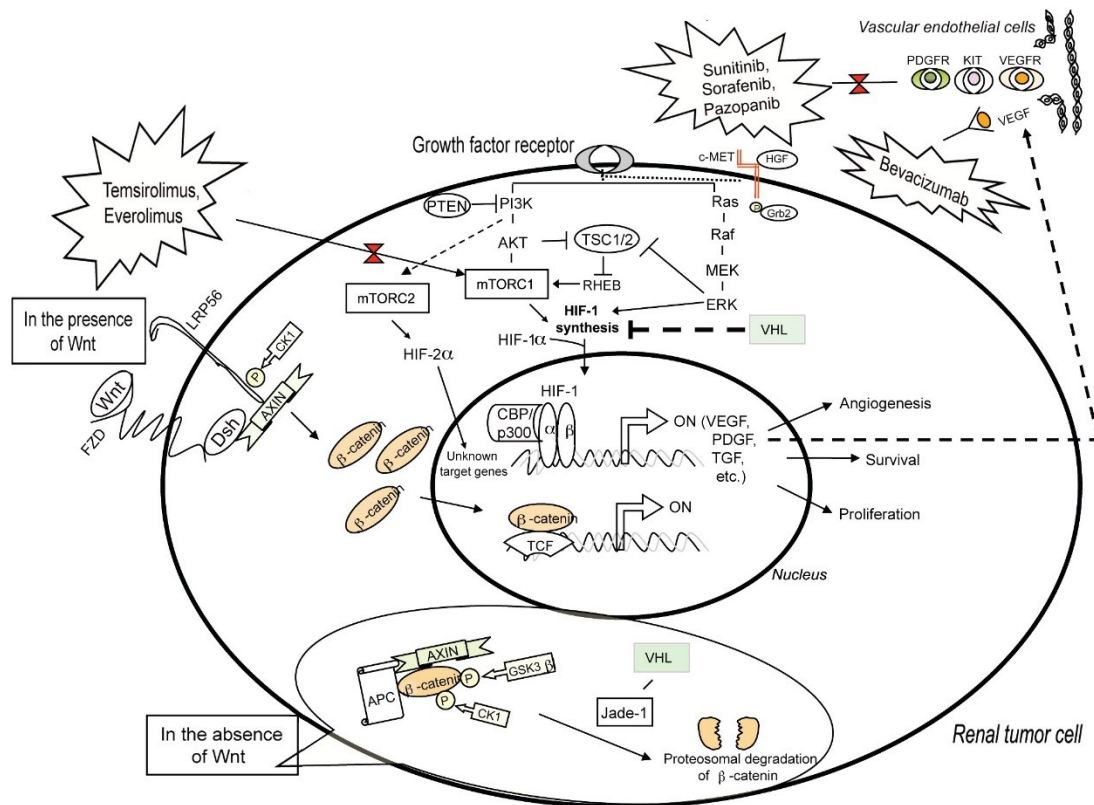


Abbildung 3: Schematische Darstellung ausgewählter Signalwege und zielgerichteter Therapien beim RCC (Banumathy & Cairns, 2010)

Neben den oben beschriebenen existieren weitere für die Tumorentstehung und -proliferation bedeutende Signalwege, wie der VEGF-Signalweg, der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, der Wnt/ β -Catenin-Signalweg, der HGF/MET-Signalweg und der Ras/MAPK-Signalweg, welche schematisch in obenstehender Abbildung dargestellt sind (Abb. 3). Zahlreiche Proteine als Teile dieser Signalwege stellen mögliche Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien bei metastasierter Erkrankung dar, von denen viele bereits einen festen Platz in den aktuell gängigen Behandlungsleitlinien innehaben. Die einzelnen Substanzen, ihre Wirkmechanismen und die Auswahlkriterien werden in späteren Kapiteln erläutert. Im Folgenden sind die wichtigsten Signalwege in der molekularen Pathogenese des ccRCC und des pRCC beschrieben.

3.3.2.1 VEGF-Signalweg

Der beschriebene LOH des VHL-Tumorsuppressorgens resultiert in einer Überexpression der Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren 1 α (HIF-1 α , engl.: hypoxia inducible factor) und 2 α (Morris et al., 2009), da der sauerstoffabhängige Abbau dieser Transkriptionsfaktoren die Bindung an das VHL-Tumorsuppressorprotein erfordert (Wiesener et al., 2001). Wie der Name bereits suggeriert, führt Hypoxie, welche bei soliden Tumoren auf Grund des schnellen Wachstums häufig vorkommt, ebenfalls zu einem

verminderten Abbau von HIF-1 α (Kaelin, 2005). Gleichmaßen können die oben beschriebenen Veränderungen im UMP-Signalweg zur Hypoxie führen.

Die Akkumulation von HIF-1 α und HIF-2 α induziert, neben weiteren Wachstumsfaktoren, die Bildung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF, engl.: vascular endothelial growth factor; Shinojima et al., 2007) sowie des von Thrombozyten abgeleiteten Wachstumsfaktors (PDGF, engl.: platelet-derived growth factor; Banumathy & Cairns, 2010). Durch ihre Bindung an die zugehörigen VEGF-Rezeptoren (VEGFR) und PDGF-Rezeptoren (PDGFR) an der Oberfläche von Endothelzellen der Blutgefäße steigern sie die Zellmigration, die Permeabilität und die Zellproliferation. Dies führt zu einer Induktion der Tumorneovaskularisation, was von zentraler Bedeutung für das Tumorwachstum ist (Berger et al., 1995).

3.3.2.2 PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

Die Proteinkinasen B (auch AKT, Gene: AKT1, AKT2, AKT3) und mTOR (engl.: mammalian target of rapamycin) sind Schlüsselstellen für onkogene Prozesse in der Zelle. Die autokrine Bindung von VEGF und PDGF an ihre Rezeptortyrosinkinasen (RTK) VEGFR und PDGFR in RCC-Tumorzellen führt zur Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), welche die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) induzieren (Banumathy & Cairns, 2010). PIP3 rekrutiert die Serin-/Threoninkinase AKT an die Zellmembran, wo sie durch Phosphorylierung an zwei unterschiedlichen Stellen, zum einen durch PDK1 (engl.: phosphoinositide-dependent kinase 1) und zum anderen durch mTOR, in diesem Fall durch den mTOR-Komplex 2 (TORC2), aktiviert wird. Diese Aktivierung verhindert durch Inaktivierung proapoptotischer Proteine wie z.B. der Procaspase 9 oder ASK1 (engl.: apoptosis signal regulating kinase 1) die Apoptose (Cardone et al., 1998; A. H. Kim et al., 2001). Zudem inhibiert die Aktivierung von AKT die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK-3 β), welche den Abbau von Promotor-Proteinen des Zellzyklus wie Cyclin D1 (Diehl et al., 1998) und den Abbau von Transkriptionsfaktoren, welche die Zellproliferation anregen, induziert. Hierzu zählen MYC, β -catenin, c-Jun (abgeleitet von ju-nana, jap.: 17, nach Entdeckung im „avian sarcoma virus 17“) und Notch (Banumathy & Cairns, 2010).

Die VEGF/PDGF gesteuerte Aktivierung von AKT führt zudem zur Aktivierung von mTOR. Das Protein mTOR fungiert als Komponente zweier unterschiedlicher Komplexe, zum einen des TORC1, welcher sensitiv auf Rapamycin ist und positiv die Proteinsynthese und den Zellzyklus reguliert, zum anderen des TORC2, welcher insensitiv auf Rapamycin ist und durch Remodulierung des Aktin-Zytoskeletts die Zellpolarität und das räumliche Zellwachstum reguliert (Wullschleger et al., 2006).

Die Phosphatase PTEN (engl.: phosphatase and Tensin homolog) unterbricht durch Dephosphorylierung von PIP3 diesen Signalweg und wirkt als Tumorsuppressorprotein hemmend auf Zellmigration und Zellteilung. Eine verminderte Expression von PTEN könnte ursächlich für die Aktivierung von AKT sein (Hara et al., 2005).

3.3.2.3 Wnt/ β -Catenin-Signalweg

Die Familie der Wnt-Glykoproteine (engl.: wingless int-1) ist ebenfalls an diversen regulatorischen Prozessen in der Zellmigration, -proliferation und -differenzierung beteiligt (Nusse & Varmus, 1982). Den wichtigsten Effektor des kanonischen Wnt-Signalwegs stellt der Transkriptions-Cofaktor β -Catenin dar, welcher eine zentrale Rolle in der Pathogenese des RCC einnimmt. In ruhenden Zellen liegt β -Catenin in einem hoch prozessiven Enzymkomplex vor, der zusätzlich CK1 (Casein Kinase 1), GSK-3 β , APCP (engl.: adenomatosis polyposis coli protein) und Axin (von engl.: axis inhibition protein) enthält (Banumathy & Cairns, 2010). β -Catenin wird von diesem Komplex in Abwesenheit von Wnt an Serin- und Threoninresten phosphoryliert und daraufhin im Proteasom abgebaut (Barker & Clevers, 2006). In Anwesenheit von Wnt akkumuliert β -Catenin durch Inhibition seiner Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Degradation. Das stabilisierte β -Catenin gelangt in den Zellkern und aktiviert nach der Bindung an die Transkriptionsfaktoren LEF1 (engl.: lymphoid enhancer-binding factor 1) und TCF7 (engl.: T-cell specific transcription factor 7) bestimmte Zielgene, wie beispielsweise das Protoonkogen MYC (Clevers, 2006). Die Wnt-vermittelten Effekte auf das Zell- und Tumorstwachstum hängen zudem mit einer Aktivierung des mTOR-Signalwegs zusammen, die durch eine Inhibition der GSK-3 β erzielt wird. Die GSK-3 β phosphoryliert in der ruhenden Zelle gemeinsam mit der AMPK (engl.: adenosine monophosphate-activated protein kinase) sequentiell den TSC2 (engl.: Tuberous Sclerosis Complex 2) und aktiviert diesen dadurch, was zur einer Inhibition von mTOR führt (Inoki et al., 2006).

Obwohl Punktmutationen, die zu einer vermehrten Aktivierung von β -Catenin bei RCCs führen, relativ selten sind (Y. S. Kim et al., 2000), konnte gezeigt werden, dass die induzierte Erhöhung des β -Catenin-Spiegels zur Bildung von RCCs bei Mäusen führt (Sansom, O. J. et al., 2005).

Da β -Catenin in Teilen durch die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität des VHL-Genprodukts degradiert wird, führt ein Verlust des VHL-Gens abermals zur Akkumulation von β -Catenin (Peruzzi et al., 2006). Der Verlust von VHL könnte zu einer kombinierten Anhäufung von β -Catenin und HIFs führen, was einen Erklärungsansatz für die besondere Malignität von ccRCCs liefern könnte (Linehan et al., 2009). Das positiv durch das VHL-Genprodukt regulierte Protein Jade-1 (engl.: gene for apoptosis and differentiation in epithelia) ubiquitiniert β -Catenin, was erneut zur Degradation von β -Catenin führt. Dies legt eine Tumorsupressorfunktion von Jade-1 nahe, dessen Spiegel bei Verlust von VHL reduziert sind. Hieraus lässt sich ein weiterer Mechanismus, über den der Verlust von VHL zur Tumorentstehung führt, ableiten (Berndt et al., 2009; Chitalia et al., 2008).

3.3.2.4 HGF/MET-Signalweg

Veränderungen in der Expression und Aktivität des HGF und seines Rezeptors, c-MET, wurden überwiegend beim pRCC beschrieben, da sie ursächlich für die Entstehung der hereditären Form des pRCC sind (Schmidt et al., 2004). Demgegenüber konnten aktivierende Punktmutationen in c-MET nur in 5-

13% der sporadischen pRCCs nachgewiesen werden; die meisten pRCCs zeigten eine Trisomie 7 ohne Mutationen von c-MET (Fischer et al., 1998).

Die Bindung von HGF an seinen Rezeptor c-MET führt zur Phosphorylierung zweier Tyrosinreste am c-terminalen Ende von c-MET und zieht eine Rekrutierung verschiedener Adapterproteine, wie Grb2 (engl.: growth factor receptor-bound protein 2), Gab1 (engl.: Grb2-associated-binding protein 1), STAT3 (engl.: signal transducer and activator of transcription 3) und PI3K, sowie eine Aktivierung des Ras/MAPK-Signalwegs (MAPK, engl.: mitogen-activated protein kinase) und des PI3K/AKT-Signalwegs nach sich, was in Tumorwachstum und Metastasierung resultiert (Eder et al., 2009). Die Phosphorylierung von c-MET induziert zudem die Phosphorylierung von β -Catenin an Tyrosinresten. Dies geschieht unabhängig von der oben beschriebenen GSK-3 β /APC-Komplex abhängigen Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten führt zur Dissoziation von β -Catenin von E-Cadherin und damit zur Translokation von β -Catenin in den Zellkern (Monga et al., 2002). Die Expression des VHL-Proteins hemmt diese HGF gesteuerte Akkumulation von β -Catenin. Ein Verlust von VHL könnte also das HGF-gesteuerte *Signaling* von β -Catenin aktivieren (Peruzzi et al., 2006).

3.3.2.5 Ras/MAPK-Signalweg

Der Ras/MAPK-Signalweg stellt eine weitere Signaltransduktionskaskade dar, an deren Ende erneut eine Regulation von Zellproliferation und -differenzierung steht. Aktivierte RTKs rekrutieren den Guanin-Nukleotid-Austauscher SOS (engl.: son of sevenless) an die Zellmembran, welcher das Ras-Protein durch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) aktiviert. Das aktivierte Ras-GTP bindet an die zytosolische Serin-/Threonin-Kinase Raf (engl.: rapidly accelerated fibrosarcoma) und aktiviert diese durch Rekrutierung an die Zellmembran (Matallanas et al., 2011). Durch Phosphorylierung ist das aktivierte Raf-Protein dazu in der Lage, die Kinasen MEK 1 und 2 (MAP/Erk-Kinase) zu aktivieren, welche gleichermaßen Erk 1 und 2 (engl.: extracellular-signal regulated kinases) phosphoryliert und damit aktiviert. Während die Raf, MEK, und Erk beinhaltende Phosphorylierungskaskade linear abläuft, wirkt sich die Aktivierung der Erk auf über 150 unterschiedliche Substrate sowohl im Zytosol als auch im Zellkern aus. Weiterhin aktiviert die MEK die MAP-Kinase, welche in den Zellkern transloziert und dort weitere untergeordnete Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, die den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung beeinflussen (Leicht et al., 2007). Obwohl aktivierende Mutationen im B-Raf-Gen bis jetzt beim RCC nicht identifiziert werden konnten, zeigte sich eine konstitutive Aktivierung des B-Raf Signalwegs (Raf, MEK, Erk) bei etwa 50% der RCCs (Oka et al., 1995).

3.4 Tumorimmunologie

Die enorme Anzahl an genetischen und epigenetischen Veränderungen, welche die meisten Tumorzellen zu eigen haben, führen zur Expression einer Vielzahl an Antigenen, welche das Immunsystem erkennen kann und die somit eine Immunantwort gegen solide Tumoren auslösen können. Um dies zu verhindern, ist es für das Überleben der Tumorzellen essenziell, spezifische Resistenzmechanismen gegen diese Immunantworten zu entwickeln. Einer der wichtigsten dieser Resistenzmechanismen beinhaltet immuninhibitorische Signalwege, die Immuncheckpoints, welche bei gesunden Zellen normalerweise die Immuntoleranz steigern und so den Kollateralschaden einer Immunantwort auf gesundes Gewebe abschwächen (Pardoll, 2012). Von klinischer Relevanz sind beim RCC aktuell vor allem die Immuncheckpoint-Komponenten CTLA-4 (engl.: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) und PD-1/PD-L1, welche Angriffspunkte für gegen sie gerichtete monoklonale Antikörper, die Immuncheckpoint-Inhibitoren, darstellen.

3.4.1 Krebs-Immunitäts-Zyklus

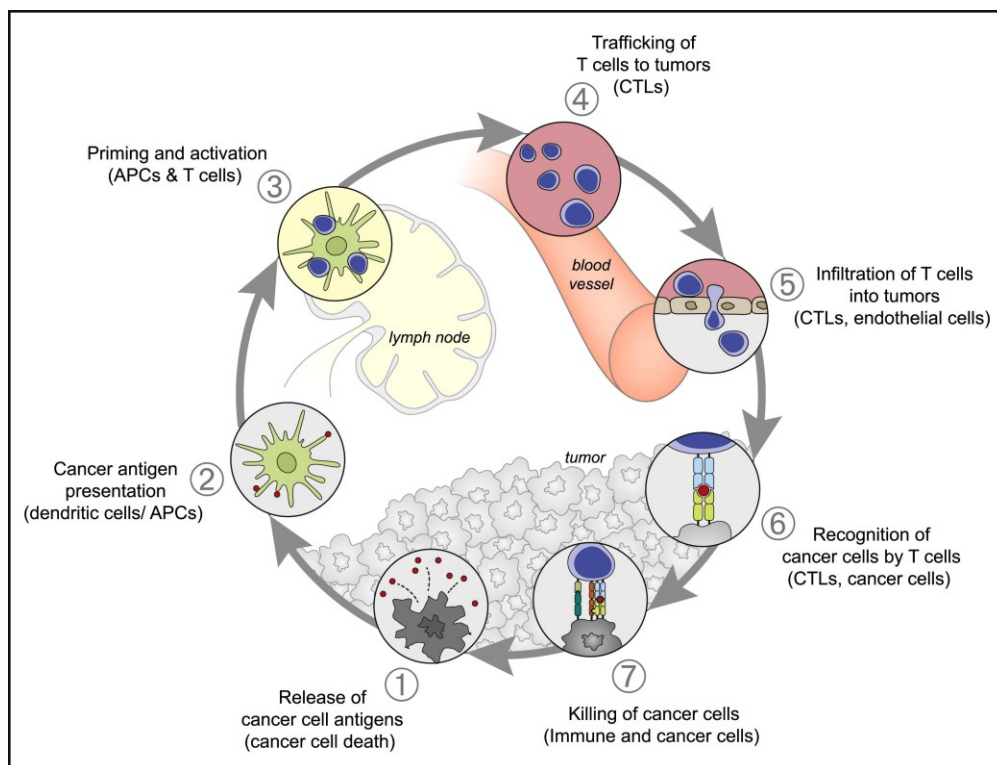


Abbildung 4: Krebs-Immunitäts-Zyklus (Chen, D. S. & Mellman, 2013)

Damit eine gegen Krebszellen gerichtete Immunantwort zu einer effektiven Abtötung von Immunzellen führt, muss eine Reihe an schrittweise ablaufenden Ereignissen eintreten, welche durch hemmende Einflüsse nicht verhindert werden dürfen (Abb. 4). Im ersten Schritt werden die während der Onkogenese freigesetzten Neoantigene der Tumorzellen durch dendritische Zellen (DC, engl.: dendritic cell) aufge-

nommen und prozessiert. Damit dies eine T-Zell-Antwort auslösen kann, müssen die Antigene von Signalen begleitet werden, welche die Immunantwort spezifizieren können, um die Induktion einer peripheren Toleranz gegenüber Tumorantigenen zu verhindern. Diese immunogenen Signale können beispielsweise proinflammatorische Zytokine oder Faktoren, die von absterbenden Tumorzellen freigesetzt werden, beinhalten (Ferguson et al., 2011).

Im zweiten Schritt präsentieren die DCs die aufgenommenen Antigene auf den Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC, engl.: major histocompatibility complex) MHC-I und MHC-II den T-Zellen (Lipitz, 2013). Dies führt zu Schritt 3, der Vorbereitung (engl.: priming) und Aktivierung der Effektor-T-Zell-Antwort gegen tumorspezifische Antigene, welche als körperfremd erkannt beziehungsweise nicht komplett durch zentrale Toleranzmechanismen identifiziert werden. Die Art und das Ausmaß der Immunantwort wird durch diesen Schritt festgelegt, wobei das Gleichgewicht zwischen Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen eine kritische Rolle für die definitive Immunantwort einnimmt (Franciszewicz et al., 2012).

In Schritt 4 wandern die aktivierten Effektor-T-Zellen zum Tumor und infiltrieren das Tumorbett in Schritt 5. Über die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor (TCR, engl.: T-cell-receptor) und dem an MHC-I gebundenen verwandten Antigen erkennen und binden die T-Zellen in Schritt 6 spezifisch an die Tumorzellen und töten diese in Schritt 7 ab. Das Absterben der Krebszellen setzt zusätzliche tumorspezifische Antigene frei, sodass in weiteren Zyklen die Breite und die Tiefe der Immunantwort gesteigert werden kann (Mellman et al., 2011).

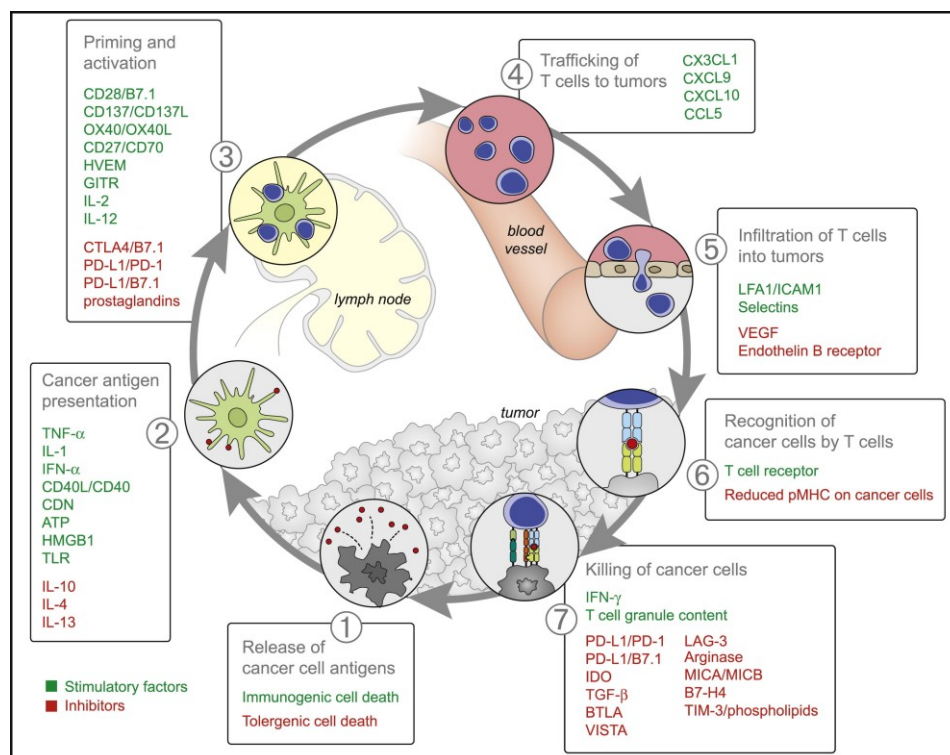


Abbildung 5: Stimulatorische und inhibitorische Faktoren im Krebs-Immunitäts-Zyklus (Chen, D. S. & Mellman, 2013)

Bei Krebspatienten ist der physiologische Ablauf dieses Zyklus gestört, er läuft nicht optimal ab. Gründe hierfür können, unter anderem, eine mangelhafte Antigendetektion oder eine Einstufung der Tumorzellen als körpereigen anstatt als körperfremd sein. Den häufigsten Grund für eine ausbleibende Immunantwort stellen jedoch inhibitorische Faktoren in der Tumormikroumgebung dar, welche die Effektor-T-Zellen supprimieren. In der vorstehenden Abbildung (Abb. 5) sind sowohl diese inhibitorischen als auch stimulierende Faktoren dargestellt (Chen, D. S. & Mellman, 2013).

3.4.2 CTLA-4

CTLA-4 ist ein Membranprotein, welches auf der Oberfläche von T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen sowie sporadisch auf regulatorischen T-Zellen exprimiert wird. Während die T-Zell-Aktivierung stets die Interaktion zwischen TCR und einem an ein MHC-Protein auf einer antigenpräsentierenden Zelle (APC, engl.: antigen presenting cell) gebundenes Antigen voraussetzt, wirkt die Aktivierung von CTLA-4 co-stimulatorisch und kann für sich genommen keine T-Zellreaktion auslösen (Verhagen et al., 2008). Die über den TCR vermittelte Aktivierung der T-Lymphozyten führt zu einer gesteigerten Produktion des CTLA-4-Rezeptors an der Zelloberfläche der T-Lymphozyten (Sansom, D.M., 2000). Die Bindung von CTLA-4 an seine Liganden, die von APCs exprimierten Membranproteine CD80 und CD86 (engl.: cluster of differentiation), bewirkt eine Aktivierung der PRKCE (engl.: protein kinase C epsilon). Dies führt zu einer Herabregulation des Proliferationssignals, APCs werden in geringerem Ausmaß stimuliert und die Intensität einer möglichen Immunantwort wird herabgesetzt (D. M. Sansom, 2000). In Abwesenheit von CTLA-4 binden CD80/86 an das von T-Zellen exprimierte CD28, was parallel zu einer gesteigerten Immunantwort und zu einer vermehrten Ausschüttung von CTLA-4 aus intrazellulären Vesikeln führt. Durch diesen Mechanismus wird ein Gleichgewicht zwischen inhibitorischen und stimulatorischen Signalen erzielt (Pardoll, 2012). Dieses Prinzip wird in der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren genutzt, indem durch die intravenöse Gabe von gegen CTLA-4 gerichteten monoklonalen Antikörpern die Immunantwort gegen solide Tumoren gesteigert wird (Camacho, 2015).

3.4.3 PD-1/PD-L1-Signalweg

Die Interaktion des Transmembranproteins PD-1 mit seinen Liganden PD-L1 und PD-L2 beeinflusst ebenfalls die Antwort des Immunsystems auf Tumorzellen, was therapeutisch bei diversen Tumorentitäten genutzt werden kann. Die Bindung zwischen von Tumorzellen und APCs exprimiertem PD-L1 und von T-Zellen exprimiertem PD-1 beeinflusst co-inhibitorisch die gegen die Tumorzellen gerichtete Immunantwort, welche auf der Interaktion von MHC und TCR in der Mikroumgebung des Tumors beruht. Durch eine Blockade dieses Signalwegs mittels intravenöser Gabe von gegen die Immuncheckpoint-Komponenten PD-1 und PD-L1 gerichteten Antikörpern lassen sich bei einem gewissen Teil der auf diese Weise behandelten Patienten hohe Ansprechraten erzielen und somit die Überlebensraten deutlich verbessern. Im Gegensatz zu CTLA-4 nimmt der PD-1-Signalweg seine entscheidende Rolle für

die Immunantwort nicht bei der initialen Aktivierung der T-Zellen, sondern bei der Regulation der inflammatorischen Antwort in peripheren Geweben ein (Pardoll, 2012).

Die Aktivierung von T-Zellen führt zu einer Hochregulation von PD-1 und einer vermehrten Expression an der Zelloberfläche von T-Zellen. Die durch die Immunantwort ausgelöste Entzündungsreaktion im peripheren Gewebe setzt inflammatorische Signale, zum Beispiel das Zytokin IFN- γ , frei, welche die Expression von PD-L1 im peripheren Gewebe induzieren. Die Bindung von PD-L1 an seinen Rezeptor PD-1 reguliert die T-Zell-Aktivität herunter, wodurch der Kollateralschaden auf benachbartes Gewebe als Antwort auf eine Infektion mit Mikroorganismen eingedämmt werden kann (Pardoll, 2012).

PD-1 wird auf einer Vielzahl von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs) bei diversen Tumorentitäten exprimiert (Ahmadzadeh et al., 2009). Gleichmaßen zeigt sich eine Hochregulation von PD-L1 an der Zelloberfläche von zahlreichen soliden Tumoren, was zu einer Immunevasion führt (Dong et al., 2002). Da sich die Expressionsmuster von PD-L1 bei unterschiedlichen Tumorentitäten relativ stark unterscheiden können, scheint eine PD-L1 Immuncheckpoint-Blockade nur bei ausgewählten Tumoren sinnvoll.

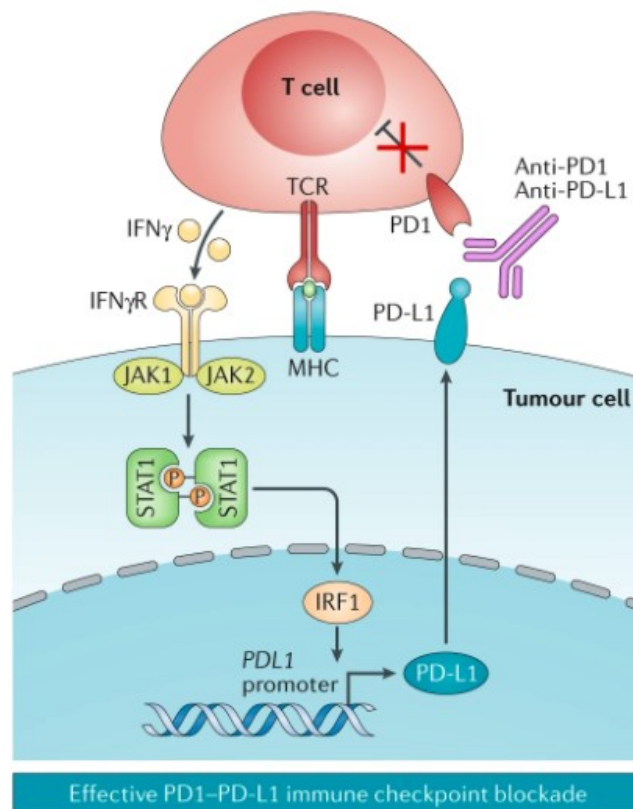


Abbildung 6: Adaptive PD-L1-Expression in Reaktion auf tumorspezifische T-Zell-Antwort (Kalbasi & Ribas, 2020)

Eine bereits vorbestehende antitumorale Immunantwort ist entscheidend für eine effektive Immuncheckpoint-Blockade. Tumorreaktive T-Zellen, welche mit ihrem TCR an MHC-Moleküle der Klasse I und II gebundene Tumor-Neoantigene erkennen, setzen IFN- γ frei. Dies resultiert in einer Aktivierung

des JAK/STAT-Signalwegs (engl.: Janus kinase), was den Transkriptionsfaktor IRF1 (engl.: interferon regulatory factor 1) aktiviert, der wiederum die Transkription von PD-L1 aktiviert. Konsekutiv wird die Expression von PD-L1 an der Tumorzelloberfläche gesteigert (Abb. 6). Antikörper, welche gegen das PD-1/PD-L1-System gerichtet sind, können diesen negativen Rückkopplungsmechanismus unterbrechen, um die antitumorale Immunantwort wiederherzustellen (Kalbasi & Ribas, 2020). Neben der membranständigen Form von PD-L1 wurden immunzytologisch auch eine zytoplasmatische und eine nukleäre Subform differenziert (Satelli et al., 2016; Qu et al., 2017). Von besonderer Bedeutung als möglicher Biomarker ist eine lösliche Form von PD-L1 im Serum (sPD-L1, engl.: soluble/serum PD-L1). Die Funktion und der Ursprung von sPD-L1 sind nicht genau verstanden. Sowohl APC und DC als auch Tumorzellen können eine Quelle für sPD-L1 darstellen (Wu, Y. et al., 2019). Der Erfolg einer Therapie mit PD-L1-Inhibitoren erschien abhängig von der sPD-L1-Konzentration im Serum der Patienten (Zhu & Lang, 2017).

3.5 Klinik und Diagnostik

Die klassische Symptomtrias aus Hämaturie, tastbarem abdominellem Tumor und Flankenschmerzen tritt nur bei etwa 9% der Patienten bei Diagnosestellung auf und weist auf einen bereits sehr fortgeschrittenen lokoregionalen Befund hin. Die meisten Tumore bleiben jedoch in frühen Stadien symptomlos (Skinner et al., 1971). Eine Varikozele, meist linksseitig, welche sich im Liegen nicht entleert, kann zudem hinweisgebend für einen Tumorzapfen in der Nierenvene sein, welcher die Gonadalvene okkludiert. Sie tritt bei bis zu 11% der erkrankten Männer auf (Pinals & Krane, 1962). Reicht ein solcher Tumorzapfen bis in die Vena cava inferior, kann es zudem zu Lungenarterienembolien kommen. Zusätzlich können unspezifische Allgemeinsymptome wie Fieber, Anämie oder Kachexie auftreten oder paraneoplastische Syndrome durch ektope Hormonbildung entstehen, im Rahmen derer es beispielsweise zu Hypercalzämien kommen kann (Gold et al., 1996). Tritt eine Leberdysfunktion ohne das Vorhandensein von Lebermetastasen auf, wird dies als Stauffer-Syndrom bezeichnet und kann bei bereits therapierten Patienten auf ein Rezidiv hindeuten (Chuang et al., 1997).

Wie oben bereits beschrieben, werden weit über 50% der RCCs zufällig als inzidentelle Karzinome diagnostiziert, bevor sie Symptome verursachen. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose haben bereits etwa 30% der Patienten Metastasen entwickelt (Ritchie & Chisholm, 1983), bei weiteren 30% kommt es im fortschreitenden Krankheitsverlauf auch noch nach chirurgischer Tumorresektion zu Fernmetastasen oder Lokalrezidiven (Rabinovitch et al., 1994). Das RCC metastasiert hämatogen, bei über 50% der Patienten sind die Metastasen pulmonal lokalisiert. Weitere häufige Metastasierungsorte sind regionale Lymphknoten (41,5%), Knochen (33,5%), Leber (17%) und das ZNS (9,8%; Chandrasekar et al., 2017). Patienten mit ungeklärter Hämaturie oder anderen Symptomen, welche auf ein RCC zurückzuführen sein könnten, sollten zeitnah eine bildgebende Diagnostik erhalten, da eine frühzeitige operative Tumorentfernung die einzige kurative Therapiemöglichkeit darstellt. Ziele der Diagnostik sind die Unterscheidung von benignen und malignen Raumforderungen, die präoperative Bestimmung von Tumorgröße

und -ausdehnung sowie die Detektion von Metastasen. Während die Sonographie eine praktikable, nicht invasive und breit verfügbare Untersuchungsmethode zur Identifizierung benigner Zysten darstellt, sind die CT und die MRT ihr in ihrer Sensitivität und Spezifität überlegen. Sie ermöglichen eine genaue Darstellung der lokalen Tumorausdehnung und einer möglichen Gefäßinvasion und spielen somit eine essentielle Rolle in der Planung der operativen Tumoresektion (Ljungberg et al., 2019).

3.6 Staging

Die TNM-Klassifikation (engl.: tumor, node, metastasis) von 2017 der UICC (Union for international cancer control) ist die geläufigste Einteilung, um die Ausdehnung eines RCCs zu beschreiben (Rini et al., 2017). Sie wird für alle histologische Subtypen verwendet. Es wird zwischen folgenden T-Stadien unterschieden:

- TX: Primärtumor nicht beurteilbar
- T0: Kein Nachweis eines Primärtumors
- T1: Tumor ≤ 7 cm in der größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
 - T1a: Tumor ≤ 4 cm in der größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
 - T1b: Tumor > 4 cm, aber ≤ 7 cm in der größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
- T2: Tumor > 7 cm in der größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
 - T2a: Tumor > 4 cm, aber ≤ 10 cm in der größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
 - T2b: Tumor > 10 cm in der größten Ausdehnung, begrenzt auf die Niere
- T3: Tumorausdehnung in größere Venen oder perirenales Gewebe, jedoch nicht in die ipsilaterale Nebenniere oder über die Gerotafaszie hinaus
 - T3a: Tumorausdehnung in die Nierenvene oder in deren segmentale Äste, oder Invasion in das Nierenbeckenkelchsystem, oder in perirenales Fettgewebe
 - T3b: Tumorausdehnung in die Vena cava unterhalb des Diaphragmas
 - T3c: Tumorausdehnung in die Vena cava oberhalb des Diaphragmas oder Invasion in die Wand der Vena cava
- T4: Tumorausdehnung über die Gerotafaszie hinaus, kontinuierliche Ausbreitung in die ipsilaterale Nebenniere eingeschlossen

Der Buchstabe N definiert den Lymphknotenstatus, wobei N1 das Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen beschreibt und N0 das Fehlen ebendieser. NX steht dafür, dass keine Aussage über den Lymphknotenstatus getroffen werden kann.

Mit dem Buchstaben M wird analog hierzu der Status der Fernmetastasierung beschrieben. M1 beschreibt wieder das Vorhandensein einer oder mehrerer Fernmetastasen, M0 die Metastasenfreiheit. Gemäß dieser Klassifikation werden verschiedene Prognosestadien festgelegt (Tab. 3).

Tabelle 3: Stadieneinteilung nach UICC, 2017 (Rini et al., 2017)

UICC-Stadium	T-Stadium	N-Stadium	M-Stadium
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T1/T2	N1	M0
	T3	Jedes N	M0
IV	T4	Jedes N	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

3.7 Prognostische Faktoren

3.7.1 UICC Stadien

Bei Patienten mit einem lokal begrenzten RCC bietet die chirurgische Tumoresektion einen kurativen Therapieansatz. Da das RCC jedoch bei vielen Patienten lange Zeit symptomlos bleibt, wird die Diagnose häufig erst gestellt, wenn der Tumor bereits lokal fortgeschritten oder metastasiert ist. Zudem treten bei zahlreichen Patienten mit initial resektablen Tumoren im Krankheitsverlauf Rezidive oder Fernmetastasen auf.

Während Patienten mit RCCs in frühen Stadien generell sehr gute 5-Jahres-Überlebensraten nach Tumoresektion aufweisen, nämlich, je nach Publikation, 90%-100% im Stadium I und 75-95% im Stadium II (Pantuck et al., 2001), scheint die Prognose deutlich ungünstiger auszufallen, wenn der Tumor in diesen Stadien bereits einen Einbruch in das Nierenbeckenkelchsystem zeigte. Die 5-Jahres-Überlebensrate sank in diesen Fällen auf 43% (Verhoest et al., 2009).

Die 5-Jahres-Überlebensraten bei Patienten im Stadium III, welche sich einer Tumornephrektomie unterzogen, reichen von 59-70% (Pantuck et al., 2001), wobei Unklarheit darüber herrscht, ob die Tumorausdehnung in das perinephritische Fettgewebe für sich genommen schon einen negativen Effekt auf die Prognose haben könnte (Siemer et al., 2005; Chevinsky et al., 2015). Hingegen konnte gezeigt werden, dass bei Patienten im Stadium IIIa die Tumorgöße einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hat. So beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit Tumoren < 4 cm 77%, zwischen 4 cm und 7 cm 54% und > 7 cm 46% (Siddiqui et al., 2007).

Bei Patienten mit metastasierter Erkrankung (UICC Stadium IV) zeigen sich deutlich schlechtere Ergebnisse. Bei Patienten, welche sich keiner Behandlung unterziehen, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate unter 10% (Motzer et al., 1999). Während unter systemischer Therapie mit Zytokinen die durchschnittliche Überlebenszeit bei etwas über einem Jahr lag, können mittlerweile durch den Einsatz gezielter Krebstherapien und Immuntherapien mittlere Überlebensraten von ca. 28 Monaten erreicht werden (Heng, Choueiri et al., 2014; Motzer, Hutson et al., 2013). Bereits im Jahr 1999 wurde nach der Analyse retrospektiver Daten des Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) in New York ein Scoring-System entwickelt (Tab. 4), anhand dessen sich die Patientenpopulation mit metastasierter Erkrankung

in drei Prognosegruppen einteilen lässt (Tab. 5; Motzer et al., 1999). Die fünf Variablen, aus denen das Modell initial bestand, nämlich der Karnofsky-Index, der Hämoglobinspiegel, der korrigierte Serum-Calciumspiegel, die Konzentration der Lactatdehydrogenase (LDH) und ob eine Tumornephrektomie durchgeführt wurde oder nicht, schienen in einer multivariaten Datenanalyse das Überleben der Patienten signifikant zu beeinflussen. Dieses Scoring-System wurde wiederholt extern validiert und seine Gültigkeit bestätigt (Mekhail et al., 2005).

Tabelle 4: Motzer-/MSKCC-Score (Motzer et al., 1999)

Kriterium	1 Punkt	0 Punkte
Zeit von der Diagnosestellung bis zum Beginn einer systemischen Therapie	Weniger als 1 Jahr	Mehr als 1 Jahr
Hämoglobinspiegel	Unter dem Normwert (♂: < 13,5 g/dl; ♀: < 12,0 g/dl)	Über der unteren Normwertgrenze (♂: > 13,5 g/dl; ♀: > 12,0 g/dl)
Korrigiertes Serum-Calcium	Über 10 mg/dl	Unter 10 mg/dl
Laktatdehydrogenase (LDH)	Über dem 1,5-fachen Normwert (=140 U/l)	Unter dem 1,5-fachen Normwert (=140 U/l)
Karnofsky-Index	Unter 80%	Über 80%

Tabelle 5: Prognosegruppen nach Motzer (Motzer et al., 1999)

Punktwert im Motzer-Score	Risikogruppe	Mediane Überlebenszeit
0	Niedriges Risiko	30 Monate
1-2	Mittleres Risiko	14 Monate
3-5	Hohes Risiko	5 Monate

2013 wurde dieses Modell mit dem International Metastatic RCC Database Consortium (IMDC-) Scoring-Modell (Tab. 6) verglichen. Obwohl die beiden Modelle sich ähneln, verfügt das IMDC-Modell sowohl über eine genauere prognostische Aussagekraft als auch über eine höhere Genauigkeit im Falle von Reklassifizierungen (Tab. 7; Heng et al., 2013). Zudem konnte es auch für Patienten, welche mit Immuncheckpoint-Inhibitoren therapiert werden, validiert werden (Yip et al., 2017).

Tabelle 6: IMDC-Risikomodell beim metastasierten RCC (Heng et al., 2009)

Kriterium	1 Punkt	0 Punkte
Zeit von der Diagnosestellung bis zum Beginn einer systemischen Therapie	Weniger als 1 Jahr	Mehr als 1 Jahr
Hämoglobinspiegel	Unter dem Normwert (♂: < 13,5 g/dl; ♀: < 12,0 g/dl)	Über der unteren Normwertgrenze (♂: > 13,5 g/dl; ♀: > 12,0 g/dl)
Korrigiertes Serum-Calcium	Über 10 mg/dl	Unter 10 mg/dl
Anzahl der neutrophilen Granulozyten	Über dem oberen Grenzwert (~2.0-7.0×10 ⁹ Zellen/l)	Unter dem oberen Grenzwert (~2.0-7.0×10 ⁹ Zellen/l)
Thrombozytenzahl	Über dem oberen Grenzwert (~150,000-400,000 Zellen/μl)	Unter dem oberen Grenzwert (~150,000-400,000 Zellen/μl)
Karnofsky-Index	Unter 80%	Über 80%

Tabelle 7: Risikogruppen nach IMDC (Heng et al., 2013)

Punktwert	Risikogruppe	Mediane Überlebenszeit
0	Niedriges Risiko (low risk)	43,2 Monate
1-2	Mittleres Risiko (intermediate risk)	22,5 Monate
3-6	Hohes Risiko (high risk)	7,8 Monate

3.7.2 Tumorgrading und klinische Aspekte

Ob und inwiefern der histopathologische Subtyp die Prognose beeinflusst, konnte bis jetzt nicht abschließend geklärt werden. Während Patard et al. keine prognostischen Unterschiede zwischen klarzelligen oder papillären RCCs identifizieren konnten, kamen Leibovich et al. zu dem Ergebnis, dass ccRCCs mit einer schlechteren Prognose verbunden sind (Patard et al., 2005; Leibovich et al., 2010). Es wird zudem davon ausgegangen, dass seltenere Entitäten, wie zum Beispiel Ductus-Bellini-Karzinome oder RCCs mit sarkomatoiden Anteilen mit einer niedrigeren Lebenserwartung assoziiert sind als klarzellige oder papilläre RCCs (Golshayan et al., 2009).

Weiterhin stellt das histologische Tumorgrading einen wichtigen prognostischen Faktor beim RCC dar. Das am häufigsten verwendete Klassifikationssystem nach Fuhrmann unterscheidet in vier Stadien abhängig von Zellkernmorphologie, -größe und dem Vorhandensein von Nucleoli und Mitosen (Novara et al., 2007). Die krankheitsspezifischen Überlebensraten bezogen auf das histologische Grading betragen für Stadium I 89%, für Stadium II 65% und für Stadium III bis Stadium IV 45% (Tsui et al., 2000).

Zusätzlich zu den genannten anatomischen Gesichtspunkten können auch klinische Aspekte das Überleben beeinflussen. So gehen beispielsweise ein niedriger Leistungsstatus, ermittelt durch den Karnofsky-Index oder den etwas vereinfachten ECOG-Score (engl.: „Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status“), das Auftreten von Symptomen, paraneoplastischen Syndromen oder Adipositas mit einer schlechteren Prognose einher (Patard et al., 2004; Calle et al., 2003). Der Karnofsky-Index und der ECOG-Score sind hierbei Systeme, welche das allgemeine Wohlbefinden und die Möglichkeit des Ausübens der Aktivitäten des täglichen Lebens bei Krebspatienten objektivierbar machen sollen.

Um die Prognose für einen Patienten, der an einem RCC erkrankt ist, bestmöglich einschätzen zu können, müssen also sowohl die anatomische und histologische Tumoreinteilung als auch die klinischen Prognoseparameter zusammengeführt werden. Das Prognosemodell, welches in der klinischen Praxis häufig Verwendung findet und neben den oben beschriebenen Scoring-Systemen nicht nur Patienten im metastasierten Stadium berücksichtigt, wurde von Zisman et al. unter dem Namen UISS (University of California, Los Angeles integrated staging system) etabliert. Es kombiniert das TNM-System mit dem ECOG-Performance-Score und der Fuhrmann-Klassifikation und ermöglicht so eine akkurate Einteilung der Patienten in fünf Prognosegruppen (Zisman et al., 2001).

3.7.3 Molekulare Marker

DNA-Microarrays (engl.: desoxy ribuncleic acid) aus Tumorgewebe ermöglichen die simultane Untersuchung und den Vergleich der histologischen und immunhistochemischen Merkmale verschiedener Tumoren, wodurch möglicherweise prognostische Indikatoren für das RCC identifiziert werden können. Obwohl zum jetzigen Zeitpunkt keiner dieser Faktoren klinische Anwendung in der Diagnostik oder Therapieplanung findet, scheinen einige dieser Faktoren vielversprechende prognostische Marker bei Patienten mit ccRCC zu sein (Kosari et al., 2005). Im Folgenden sind Beispiele für Marker genannt, welche potenziell mit einer schlechteren Prognose für Patienten mit ccRCC verbunden sein könnten:

- Expression von PD-L1 an der Oberfläche von Tumorzellen (Thompson & Kwon, 2006)
- Niedrige Expressionsspiegel der Carboanhydrase 9 (CA-IX) (Li et al., 2008)
- Hohe Expressionsspiegel des Proliferationsmarkers Ki-67 (Bui et al., 2004)
- Hohe Expressionsspiegel von HIF-1 α (Klatte et al., 2007)
- Expression des onkofötalen RNA-bindenden Proteins IMP3 (Jiang et al., 2006)
- Deletion des Chromosoms 9 (La Rochelle et al., 2010)

Diese und weitere Marker sind aktuell Gegenstand der Forschung bei der Suche nach Faktoren, welche die Wahrscheinlichkeit des Ansprechens von Tumoren auf zielgerichtete medikamentöse Tumorthera-pien vorhersagen könnten. Sie bieten gleichzeitig neue Ansatzpunkte für diese zielgerichteten Therapien bei metastasiertem RCC.

3.8 Therapie

Die Therapie des Nierenzellkarzinoms richtet sich maßgeblich nach dem Tumorstadium bei Diagnosestellung und der Prognose des Patienten. Während in niedrigen Tumorstadien chirurgische Therapiemaßnahmen im Vordergrund stehen, stellen im metastasierten Erkrankungsstadium zielgerichtete molekulare Therapien und Immuntherapien das Mittel der Wahl dar.

3.8.1 Chirurgische Tumorresektion

In den UICC-Stadien I-III kann das RCC mit einer kurativen Zielsetzung chirurgisch behandelt werden. Unter Berücksichtigung diverser Faktoren wie beispielsweise der Tumorgröße und -lokalisation, der Nierenfunktion und dem Vorhandensein von multiplen oder bilateralen Tumoren oder einer funktionellen Einzelniere wird zwischen verschiedenen operativen Herangehensweisen gewählt.

Eine radikale Tumornephrektomie sollte bei Tumoren >7 cm und bei zentral gelegenen Tumoren erfolgen. Zudem gilt eine Nephrektomie als indiziert, wenn ein Lymphknotenbefall, eine Veneninvasion oder ein Befall der ipsilateralen Nebenniere vorliegt. Sollte letzteres der Fall sein, können in einigen Fällen durch die zusätzliche Resektion der Nebenniere auch RCCs im Stadium IV potenziell kurativ therapiert werden (Ljungberg et al., 2019). Die Nebennierenresektion gehört, davon abgesehen, nicht mehr zum Standardvorgehen bei radikaler Nephrektomie (Kuczyk et al., 2002). Die radikale Nephrektomie kann laparoskopisch oder offen chirurgisch durchgeführt werden, wobei die beiden Verfahren onkologisch als gleichwertig zu betrachten sind (Colombo et al., 2008). Die offene radikale Nephrektomie kann durch lumbale, transperitoneale oder thorakoabdominelle Zugänge erfolgen. Zudem kann die Nephrektomie retroperitoneoskopisch oder roboterassistiert durchgeführt werden. Die laparoskopische radikale Nephrektomie hat das offen chirurgische Vorgehen auf Grund von besseren Ergebnissen in Bezug auf postoperative Schmerzen und Erholungsdauer in den meisten Zentren bei einer Tumorgröße von <10 cm abgelöst (Burgess et al., 2007). Unabhängig vom gewählten operativen Verfahren sollte stets versucht werden, das Resektat intakt zu bergen und nicht zu zerkleinern, um eine möglichst akkurate pathologische Untersuchung zu ermöglichen (Cohen et al., 2005).

Bei einer Tumorgröße von ≤ 7 cm sollte, wenn technisch möglich, eine Nierenteilresektion erfolgen, um möglichst viel gesundes Nierenparenchym und somit einen Teil der Nierenfunktion zu erhalten (Ljungberg et al., 2019). Dies gilt insbesondere für Patienten, die nur über eine funktionierende Niere verfügen, einen bilateralen Befall aufweisen oder ohnehin schon unter einer Einschränkung der Nierenfunktion im Sinne einer chronischen Nierenerkrankung leiden (Huang et al., 2006). Onkologisch gelten die radikale und die partielle Nephrektomie als gleichwertig (Van Poppel et al., 2011). Auch bei der Nierenteilresektion haben sich offen chirurgische, retroperitoneoskopische und robotisch assistierte Operationstechniken etabliert. Obwohl die laparoskopische Nierenteilresektion eine technisch anspruchsvolle Operation darstellt, zeigten sich für die roboterassistierte laparoskopische Nierenteilresektion vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf perioperativen Blutverlust, Komplikationsraten und Krankenhausverweildauer im Vergleich zur offenen Nierenteilresektion (Wu, Z. et al., 2014).

Obwohl bei Patienten mit metastasierter Erkrankung eine kurative Tumornephrektomie nicht mehr möglich ist, kommt bei gewissen Patienten vor Beginn einer systemischen Therapie eine zytoreduktive Tumornephrektomie in Betracht, um die Tumormasse zu verringern und um möglichst ein Gleichgewicht zwischen Tumor- und immunkompetenten Zellen wiederherzustellen (Heng, Wells et al., 2014).

Bei speziell ausgewählten Patienten kann zudem die Möglichkeit der Metastasenresektion in Betracht gezogen werden, um das Überleben zu verlängern (Alt et al., 2011).

3.8.2 Aktive Überwachung

Ältere Patienten und vor allem Patienten mit ausgeprägten Vorerkrankungen sind in vielen Fällen für eine chirurgische Tumoresektion nicht geeignet, da bei ihnen eine Operation nur mit sehr hohem Operationsrisiko durchführbar wäre (Santos Arrontes et al., 2008). Zudem wachsen die meisten kleineren RCCs sehr langsam, haben eine geringe Metastasierungsneigung und verursachen nur selten Symptome (Lamb et al., 2004). Unter diesen Umständen kann eine aktive Tumorüberwachung mit periodischer Reevaluation einen sinnvollen Therapieansatz darstellen (Wehle et al., 2004).

3.8.3 Chemo-, Hormon- und Radiotherapie

Gegenwärtig besitzen weder gängige Chemotherapeutika noch Hormontherapien einen Stellenwert in der Therapie des RCC, da das RCC als weitestgehend chemotherapieresistent gilt (Yagoda et al., 1993). Lediglich bei seltenen Sammelrohrkarzinomen oder medullären RCCs werden platinhaltige Chemotherapeutika angewendet (Oudard et al., 2007).

Ebenfalls als resistent gelten RCCs für Radiotherapien, lediglich in der Behandlung von solitären oder wenigen Metastasen beispielsweise im Gehirn oder in der Behandlung von schmerzhaften Knochenmetastasen kann die Radiotherapie eine Behandlungsalternative sein (Lutz et al., 2017; Sperduto et al., 2018).

3.8.4 Adjuvante Therapiemaßnahmen

Bis dato konnten keine Vorteile der Durchführung einer adjuvanten zielgerichteten systemischen Therapie oder einer adjuvanten Immuntherapie gezeigt werden. Insbesondere zeigte sich bis jetzt für keine getestete Substanz in der adjuvanten Anwendung ein Überlebensvorteil, sondern lediglich ein Anstieg der Rate an unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen. Insofern wird von der Durchführung einer adjuvanten Therapie außerhalb von klinischen Studien zum aktuellen Zeitpunkt abgeraten (Scherr et al., 2011).

3.8.5 Molekulare zielgerichtete Therapie

Durch genaueres Verständnis der oben beschriebenen molekularen Pathogenese des RCC konnten der VEGF-Signalweg und der mTOR-Signalweg als wichtige Angriffspunkte für therapeutische Interventionen bei Patienten mit unresektablen Tumoren oder bei Patienten mit metastasierter Erkrankung identifiziert werden.

3.8.5.1 Antiangiogenetische Therapie (VEGF-Signalweg-Inhibitoren)

Es existieren zwei unterschiedliche Ansätze, um den VEGF-Signalweg zu blockieren: Zum einen werden niedermolekulare Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs) verwendet, um die intrazelluläre Domäne des VEGF-Rezeptors zu blockieren, zum anderen wird der monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab eingesetzt, um zirkulierendes VEGF zu binden und eine Aktivierung des VEGF-Rezeptors zu verhindern. Die Therapie mit VEGF-Inhibitoren weist eine signifikante Toxizität auf, sodass unerwünschte Arzneimittelwirkungen regelhaft auftreten und zum Therapieabbruch oder zum Wechsel auf eine andere Substanz führen. In unterschiedlichen Häufigkeiten und abhängig von der eingesetzten Substanz kommt es zu arterieller Hypertonie, arteriellen und venösen thrombembolischen Ereignissen, linksventrikulärer Dysfunktion, Myokardischämie, Blutungen, Fatigue, Diarrhoen, akutem Nierenversagen, Darmperforationen und -fistelbildung, Myelodepression, Hypothyreose, Hepatotoxizität, Sarkopenie, Stomatitis, prolongierter Wundheilung, zum Auftreten einer palmar-plantaren Erythrodyssäthesie, zur Entstehung von Aortendissektionen oder -aneurysmen sowie zum Auftreten zahlreicher weitere Symptome (Ranpura et al., 2011; Schutz et al., 2012; Sivendran et al., 2012). Nachfolgend findet sich eine Beschreibung der beim RCC eingesetzten Substanzen dieser Wirkstoffgruppe.

Pazopanib:

Pazopanib ist ein oraler Wirkstoff, der die mit dem VEGFR, PDGFR und dem Kit-Rezeptor assoziierten RTKs inhibiert. Die Aktivität von Pazopanib konnte initial in einer Phase-III-Studie nachgewiesen werden, in der 435 Patienten in niedriger oder mittlerer Risikogruppe randomisiert entweder Pazopanib oder Placebo erhielten, wobei ungefähr die Hälfte der Patienten zuvor eine Zytokintherapie erhalten hatten. Verglichen mit Placebo führte die Gabe von Pazopanib zu einem signifikanten Anstieg der progressionsfreien Überlebenszeit (PFS, engl.: progression free survival) von median 9 vs. 4 Monate. Es konnte jedoch keine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens gezeigt werden, was am ehesten auf die hohe Rate an Crossover-Therapien und auf den Einsatz von anderen Therapieoptionen nach Progression bei Patienten im Placebo-Arm zurückzuführen ist (Sternberg et al., 2010).

Sunitinib:

Sunitinib ist ein TKI, der sowohl den VEGFR als auch weitere mit dem PDGFR assoziierte RTKs inhibiert. Die orale Gabe von Sunitinib erfolgt aktuell in einem Schema von 2 Wochen Einnahme gefolgt von einer Woche Therapiepause, um die unerwünschten Effekte der Therapie zu reduzieren (Najjar et

al., 2014). Der Nutzen von Sunitinib wurde zuerst in einer Phase-III-Studie an 750 Patienten gezeigt, welche in überwiegender Mehrzahl einer guten oder mittleren Prognosegruppe zugeordnet werden konnten. Die Patienten wurden auf zwei Gruppen randomisiert, eine Gruppe erhielt Sunitinib, die andere Gruppe IFN- α . Es zeigte sich eine signifikant höhere Therapieansprechrate, ein signifikant verlängertes PFS von median 11 vs. 5 Monate sowie ein signifikant verlängertes Gesamtüberleben von median 26,4 vs. 21,8 Monate (Motzer et al., 2009).

Sunitinib und Pazopanib wurden in zwei unterschiedlichen randomisierten Studien miteinander verglichen, wobei sich eine ähnliche Effektivität beider Wirkstoffe zeigte. Eine höhere Sicherheit und eine höhere Lebensqualität sahen die Autoren dieser Studien jedoch bei der Anwendung von Pazopanib (Motzer, Hutson et al., 2013). In der PISCES-Studie erhielten 169 Patienten doppel-verblindet entweder zuerst Pazopanib und im Anschluss Sunitinib oder umgekehrt. Primärer Endpunkt der Studie war die Präferenz der Patienten für eine der beiden Substanzen, wobei sich auf Grund des günstigeren Nebenwirkungsprofils die große Mehrheit der Patienten (70% vs. 22%) für Pazopanib entschieden (Escudier et al., 2014).

Cabozantinib:

Cabozantinib ist ein niedermolekularer TKI, der ebenfalls den VEGFR als Angriffsziel hat. Zudem inhibiert Cabozantinib das c-Met Protoonkogen. Cabozantinib wurde zum einen mit Everolimus bei zuvor bereits behandelten Patienten und zum anderen mit Sunitinib bei zuvor unbehandelten Patienten verglichen. In der Phase-III METEOR-Studie wurden 658 zuvor bereits behandelte Patienten auf die Gabe von Cabozantinib oder Everolimus randomisiert. Alle eingeschlossenen Patienten hatten einen Progress nach Erhalt eines VEGF-TKI gezeigt, 69% waren zuvor mit nur einem, 31% mit zwei oder mehr verschiedenen Therapieregimen behandelt worden. Es zeigte sich sowohl eine signifikante Verlängerung des medianen PFS (7,4 vs. 3,9 Monate) als auch des medianen Gesamtüberlebens (21,4 vs. 17,1 Monate), jedoch zeigte sich auch eine signifikante Toxizität unter Gabe von Cabozantinib. So erlitten 68% der mit Cabozantinib behandelten Patienten schwerwiegende Nebenwirkungen (Choueiri et al., 2015). In der CABOSUN-Studie erhielten 157 Patienten mit intermediate- bis high-risk metastasiertem RCC, welche zuvor noch keine Therapie erhalten hatten, randomisiert täglich entweder Cabozantinib oder Sunitinib. Es konnte eine signifikante Verlängerung des PFS (8,6 vs. 5,3 Monate) sowie eine nicht-signifikante Erhöhung des Gesamtüberlebens (26,6 vs. 21,2 Monate) bei vergleichbarem Risikoprofil zwischen beiden Substanzen gezeigt werden. Das Nebenwirkungsprofil entsprach ebenfalls in etwa der während der METEOR-Studie für Cabozantinib beobachteten Toxizität (Choueiri, Halabi et al., 2017).

Sorafenib:

Sorafenib ist ein potenter, oral verfügbarer, niedermolekularer Inhibitor verschiedener RTKs, einschließlich VEGFR2, FLT3 (engl.: fms like tyrosine kinase 3), PDGFR und FGFR1 (engl.: fibroblast growth factor receptor-1). Es inhibiert zudem C-Raf und sowohl Wildtyp als auch mutiertes B-Raf. Der

Einsatz von Sorafenib ist hauptsächlich limitiert auf den Einsatz als Zweit- oder Drittlinientherapeutikum. Bei zuvor unbehandelten Patienten hat Sorafenib keinen Stellenwert. Im Vergleich von Sorafenib mit IFN- α bei zuvor unbehandelten Patienten konnte zwar eine höhere Lebensqualität, jedoch keine Verlängerung des PFS gezeigt werden (Escudier et al., 2009). Bei zuvor bereits mittels Zytokintherapie behandelten Patienten, die darunter einen Progress gezeigt hatten, wurde Sorafenib gegen Placebo in einer Phase-III-Studie randomisiert. Hier zeigte sich ein signifikant verlängertes PFS (5,5 vs. 2,8 Monate), ohne eine signifikante Verlängerung des Gesamtüberlebens nachweisen zu können (Escudier, Eisen et al., 2007).

Axitinib:

Axitinib, ebenfalls oral verfügbar, ist ein Inhibitor von VEGFR1, VEGFR2 und VEGFR3. Ein direkter Vergleich von Axitinib und Pazopanib oder Sunitinib als Initialtherapie bei zuvor unbehandelten Patienten existiert aktuell nicht. Auch mit Cabozantinib wurde bis dato kein Vergleich als Zweitlinientherapie durchgeführt. In zwei kontrollierten, randomisierten Studien wurde Axitinib gegen Sorafenib sowohl bei zuvor unbehandelten als auch bei Patienten, welche zuvor eine Zytokin- oder VEGF-Inhibitor-Therapie erhalten hatten, randomisiert. In beiden Studien wurde bei vergleichbarem Nebenwirkungsprofil ein Trend in Richtung eines verlängerten PFS gezeigt, ohne jedoch ein verlängertes Gesamtüberleben nachweisen zu können (Motzer, Escudier et al., 2013).

Bevacizumab:

Der monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab bindet zirkulierendes VEGF, um die Interaktion mit dem VEGFR zu unterbinden. In zwei Phase-III-Studien wurde bei zuvor unbehandelten Patienten die Gabe von Bevacizumab mit IFN- α gegen die Gabe von IFN- α mit Placebo randomisiert. Es zeigte sich bei beiden Studien eine signifikante Verlängerung des PFS in den Bevacizumab plus IFN- α Gruppen sowie ein Trend Richtung Verlängerung des Gesamtüberlebens in diesen Gruppen (Escudier, Pluzanska et al., 2007; Rini et al., 2010). Ein Vergleich zwischen einer Bevacizumab Monotherapie und einer IFN- α Monotherapie existiert aktuell nicht.

In der BEST-Studie wurden 331 Patienten, welche zuvor keine antiangiogenetische Therapie erhalten hatten, auf 4 verschiedene Gruppen randomisiert: Bevacizumab Monotherapie, Bevacizumab plus Temsirolimus, Bevacizumab plus Sorafenib oder Sorafenib plus Temsirolimus. In Bezug auf das PFS konnte kein signifikanter Unterschied zwischen diesen 4 Gruppen gezeigt werden, die Rate an schwerwiegenden therapieassoziierten Nebenwirkungen war signifikant geringer in der Bevacizumab-Monotherapie-Gruppe als in allen anderen Kombinationsgruppen (Flaherty et al., 2015).

3.8.5.2 mTOR-Signalweg-Inhibitoren

Die Inhibitoren des oben beschriebenen mTOR-Signalwegs, Temsirolimus und Everolimus, zeigen nur in begrenztem Maße antitumorale Aktivität beim RCC, weswegen ihnen in der Therapie des metastasierten RCC lediglich eine Nischenrolle zukommt. Sie werden lediglich bei Patienten, deren Erkrankung refraktär gegenüber der initialen Behandlung mit VEGFR-TKIs oder Immuncheckpoint-Inhibitoren ist, sowie bei Patienten mit nachgewiesenen Mutationen im PI3K-Signalweg eingesetzt. Die Therapie mit mTOR-Inhibitoren ist ebenfalls mit multiplen Nebenwirkungen assoziiert, wobei jedoch besonders schwerwiegende Ereignisse ungewöhnlich sind. Ungeachtet dessen werden lebensbedrohliche Nebenwirkungen beschrieben. So kann es bei der Infusion von Temsirolimus zu Hypersensitivitätsreaktionen kommen (Hutson et al., 2008). Bei beiden Substanzen kann es, je nach Studie, bei 0,5% bis 5% aller behandelten Patienten zur Entwicklung einer Pneumonitis kommen (Dabydeen et al., 2012).

Temsirolimus:

Obwohl in randomisierten Studien eine antitumorale Aktivität von Temsirolimus bei fortgeschrittenem oder metastasiertem RCC nachgewiesen werden konnte, werden andere Therapieoptionen sowohl als Erst- als auch als Zweitlinientherapie präferiert. In einer Phase-III-Studie an 626 zuvor unbehandelten Patienten, die auf die Gabe von Temsirolimus als Monotherapie, IFN- α als Monotherapie oder die kombinierte Gabe von Temsirolimus und IFN- α randomisiert wurden, konnte ein signifikanter Anstieg des medianen Gesamtüberlebens durch die Gabe von Temsirolimus im Vergleich zu IFN- α beobachtet werden. Die Kombination beider Substanzen erzielte hier keinen Zusatznutzen (Hudes et al., 2007).

In der INTORSECT-Studie erhielten 512 Patienten, welche einen Progress unter Sunitinib gezeigt hatten, randomisiert entweder Temsirolimus oder Sorafenib, wobei das mediane Gesamtüberleben (12,3 vs. 16,6 Monate) in der Temsirolimus-Gruppe signifikant geringer war (Hutson et al., 2014). Die Ergebnisse der BEST-Studie wurden bereits unter Bevacizumab beschrieben.

Everolimus:

Der oral applizierbare mTOR-Inhibitor Everolimus besitzt im Vergleich zu Placebo eine antitumorale Aktivität bei Patienten mit metastasiertem RCC, konnte sich aber im Vergleich mit anderen aktiven Substanzen nicht durchsetzen (Motzer et al., 2010). So wurden in der RECORD-3-Studie 471 zuvor unbehandelte Patienten entweder auf die Gabe von Everolimus oder Sunitinib randomisiert. Das PFS war signifikant schlechter unter Therapie mit Everolimus (7,9 vs. 10,7 Monate), auch nach Crossover von Everolimus auf Sunitinib zeigte sich ein geringeres PFS als nach dem Wechsel von Sunitinib auf Everolimus (Knox et al., 2017).

Auch zeigte sich eine deutlich geringere Aktivität von Everolimus gegenüber Cabozantinib (METEOR-Studie, s.o.) und gegenüber Nivolumab bei zuvor bereits behandelten Patienten (Motzer et al., 2015).

3.8.6 Immuntherapie

Die Immuntherapie mit gegen Immuncheckpoint-Komponenten gerichteten monoklonalen Antikörpern ist mittlerweile als essenzieller Bestandteil in der Therapie des fortgeschrittenen RCC etabliert. Bereits im späten 19. Jahrhundert berichtete der Chirurg William Coley, dass die Injektion von abgetöteten Bakterien in Sarkome zur Tumorverkleinerung führen kann (Coley, 1891). Seitdem besteht eine enge Bindung zwischen Immunologie und Onkologie, welche über die Jahrzehnte zur Entwicklung eines breiten Spektrums an therapeutischen Optionen bei diversen Tumorentitäten geführt hat.

Nachdem klar wurde, dass die chirurgische Tumornephrektomie bei Patienten mit metastasierter Erkrankung eine Immunantwort auslöst, welche zu einer spontanen Remission von insbesondere Lungenmetastasen führen konnte (Vogelzang et al., 1992), gelang im Verlauf der Nachweis einer antitumoralen Aktivität von Zytokinen wie Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- α (IFN- α). Diese Therapien bedeuteten allerdings nur für einen Bruchteil der behandelten Patienten einen klinischen Vorteil.

3.8.6.1 Interferon- α

Der Einsatz von IFN- α spielt heutzutage keine Rolle mehr in der Therapie des RCC. IFN- α wurde mittlerweile durch deutlich wirksamere und nebenwirkungsärmere Wirkstoffe ersetzt. Während die Aktivität einer IFN- α Monotherapie in diversen großen, randomisierten Studien gezeigt werden konnte, war die Ansprechrate auf die Therapie kaum höher als 15%. Die mediane Zeit bis zum Ansprechen betrug näherungsweise 4 Monate. Das Ansprechen war zumeist nur partiell und dauerte selten länger als ein Jahr an. Die mediane Verlängerung des Gesamtüberlebens betrug 3,8 Monate. Auf Grund dieser Daten bot es sich an, die Therapie mit IFN- α als Kontrollarm für zukünftige randomisierte Studien zu verwenden (Coppin et al., 2005).

Auch die oben beschriebene Kombination von IFN- α mit beispielsweise Bevacizumab oder anderen Substanzen konnte nicht zu einer Verbesserung des klinischen Outcomes führen. Ein ähnliches Maß an andauernder Langzeit-Remission wie durch die Hochdosis-Therapie mit Interleukin-2 (IL-2) konnte hierdurch nicht erreicht werden (Gore et al., 2010).

3.8.6.2 Interleukin-2

Die Therapie des RCC mittels hochdosierter intravenöser Gabe des Zytokins IL-2 kann bei einer geringen Anzahl der so behandelten Patienten zu einer Immunantwort führen, die in einer Tumorremission resultiert. Obwohl die Therapie mit IL-2 mit einer gravierenden Toxizität verbunden ist, hält die induzierte Remission oft auch ohne weitere Therapien für mehrere Jahre an und die Mehrheit der Patienten, die komplett auf die Therapie ansprachen, bleibt lange Zeit rückfallfrei (Fyfe et al., 1995). In den Zeiten von deutlich besser verträglichen Therapieoptionen könnte IL-2 lediglich bei Patienten mit guter Prognose und Progress unter initialer Immuncheckpoint-Therapie Anwendung finden (Buchbinder et al., 2019).

3.8.6.3 Immuncheckpoint-Inhibitoren

Die zuvor verabreichten Immuntherapien (IFN- α , IL-2) wurden weitestgehend durch den Einsatz der besser verträglichen Immuncheckpoint-Inhibitoren abgelöst. Immuncheckpoint-Inhibitoren sind monoklonale Antikörper, die spezifisch an ihre jeweiligen Antigene, die Immuncheckpoints, binden und so ihre immunsupprimierende Funktion unterbinden. Auf diese Weise wird eine verstärkte Immunantwort gegen die Tumorzellen ausgelöst. Obwohl die Toxizität der Immuncheckpoint-Inhibitoren deutlich geringer als bei früheren Immuntherapien ausfällt, treten auch unter dieser Therapie regelhaft schwerwiegende immuntherapieassoziierte Komplikationen (irAEs, engl.: immune-related adverse events) auf. Hierzu zählen unter anderen in unterschiedlicher Häufigkeit: Fatigue, Infusionsreaktionen, Stomatitis, Diarrhoe, Colitis, Hepatotoxizität, Pneumonitis, Autoimmunthyreopathie, Hypophysitis, Nebenniereninsuffizienz, Diabetes mellitus Typ 1 sowie das Auftreten von opportunistischen Infektionen. Da die Ursache zumeist eine generalisierte überschießende Immunantwort ist, kann durch temporäre Immunsuppression mit beispielsweise Corticosteroiden, TNF- α -Antagonisten (engl.: tumor necrosis factor α) oder Mycophenolat Mofetil häufig eine Symptomlinderung erzielt werden, ohne die Therapie abbrechen zu müssen (Naidoo et al., 2015; Champiat et al., 2016).

Beim RCC finden folgenden Immuncheckpoint-Inhibitoren Anwendung:

PD-1-Antikörper:	Nivolumab, Pembrolizumab
PD-L1-Antikörper:	Atezolizumab, Avelumab
CTLA-4-Antikörper:	Ipilimumab

Diese Substanzen werden untereinander kombiniert oder auch in Kombinationen mit den zuvor beschriebenen Substanzklassen eingesetzt und können hohe Ansprechraten bei geringerer Toxizität beim RCC erzielen.

3.8.7 Therapieentscheidungen bei Patienten in fortgeschrittenem Erkrankungsstadium

Die Auswahl der Therapie bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung ist seit der Einführung der Therapie mittels VEGF-Inhibitoren grundsätzlich abhängig von der individuellen Einteilung des Patienten in 3 unterschiedliche Prognosegruppen, was auch noch nach Einführung der Immuncheckpoint-Inhibitoren Gültigkeit besitzt (Yip et al., 2017).

3.8.7.1 Initiale Therapie bei niedrigem Risiko

Bei der Entscheidung, Patienten in der low-risk Prognosegruppe zu therapieren, müssen viele Faktoren miteinbezogen werden. Hierzu zählen die Tumorwachstumsrate, die Tumorlokalisation sowie das Vorhandensein von tumorassoziierten Symptomen.

Insbesondere bei asymptomatischen Patienten, die noch keine Therapie erhalten haben und nur eine gering ausgeprägte Krankheitslast aufweisen, kann eine aktive Überwachung angeboten werden. Eine

systemische Therapie sollte bei diesem Patientenkollektiv eingeleitet werden, sobald zusätzliche Läsionen auftreten, bestehende Läsionen ein Wachstum aufweisen oder sobald Symptome auftreten. Sollte eine aggressivere Herangehensweise gewünscht sein, kann diesen Patienten eine Monotherapie mit VEGF-Inhibitoren, typischerweise mit Sunitinib oder Pazopanib, angeboten werden.

Bei Patienten, die zwar in die low-risk Prognosegruppe eingeordnet werden, jedoch eine ausgeprägtere Krankheitslast aufweisen, an Symptomen leiden oder deren Erkrankung schneller voranschreitet, ist die Einleitung einer Therapie indiziert. Präferiert werden hier Kombinationstherapien aus entweder Nivolumab mit Ipilimumab oder Pembrolizumab mit Axitinib. Für die kombinierte Gabe von Nivolumab und Ipilimumab konnte in der Check-Mate-214-Studie im Vergleich mit Sunitinib eine andauernde komplette Remission und ein langanhaltendes behandlungsfreies Überleben in 8% vs. 4% der Patienten mit niedrigem Risiko gezeigt werden, obwohl der Vergleich mit Sunitinib in dieser Studie zweideutige Ergebnisse lieferte – das Gesamtüberleben nach 30 Monaten betrug 80% vs. 85%, das PFS nach 30 Monaten betrug 29% vs. 35% (Motzer, Rini et al., 2019).

Die Kombinationstherapie aus Pembrolizumab und Axitinib sollte bei Patienten, welche die potenzielle Toxizität nicht tolerieren würden, nicht angewendet werden. Für diese Kombination zeigten sich im Vergleich mit Sunitinib Vorzüge sowohl im Gesamtüberleben als auch in den objektiven Ansprechraten (ORR, engl.: objective response rate). Obwohl die Daten in Bezug auf das Überleben der Patienten in der low-risk Gruppe noch nicht klar einzuordnen sind, zeigten sich nur wenige Todesfälle in beiden Gruppen, was auf eine insgesamt vergleichbar gute Verträglichkeit beider Therapieregime schließen lässt. Auch die vorliegenden Daten bezüglich des PFS und der kompletten Remissionsraten lassen bis zum aktuellen Zeitpunkt noch keine finale Bewertung zu. Es lässt sich zudem nicht sagen, ob die beobachteten Vorzüge dieses Therapieregimes synergistisch oder additiv sind und somit auch durch eine sequentielle Gabe der Substanzen erreicht werden könnten (Rini et al., 2019).

Auf Grund der Aktualität der publizierten Studien wäre eine abschließende Aussage, welches Therapieregime den größtmöglichen Erfolg verspricht oder in welcher Sequenz die unterschiedlichen Therapeutika angewendet werden sollten, verfrüht. Für die low-risk Prognosegruppe wären gemäß der aktuellen Behandlungsleitlinie ebenfalls eine Kombinationstherapie von Avelumab und Axitinib, eine Pembrolizumab Monotherapie oder die alleinige Gabe eines VEGFR-Inhibitors möglich (Escudier et al., 2019). Die Kombination aus Avelumab und Axitinib im Vergleich zu einer Sunitinib Monotherapie bei low-risk Patienten wies einen Vorteil in Bezug auf das PFS und die ORR auf, wobei eine Verbesserung des Gesamtüberlebens nicht gezeigt werden konnte (Motzer, Penkov et al., 2019). Eine Pembrolizumab Monotherapie kann bei Patienten, die auf Grund der Toxizität für andere Substanzen nicht geeignet erscheinen, erwogen werden. Ebenfalls kann bei Patienten, die für eine Immuntherapie entweder nicht geeignet sind oder diese ablehnen, die Gabe eines VEGFR-Inhibitors erfolgen (McDermott, Lee et al., 2018).

3.8.7.2 Initiale Therapie bei mittlerem oder hohem Risiko

Auf Grund der vielversprechenden Ergebnisse der oben bereits erwähnten Studien, sollten Patienten mit mittlerem oder hohem Risiko initial entweder mit einer Kombinationstherapie aus Nivolumab mit Ipilimumab oder mit einer Kombinationstherapie aus Pembrolizumab mit Axitinib behandelt werden. Da für die Kombination von Avelumab und Axitinib bis jetzt in randomisierten Studien kein Vorteil für das Gesamtüberleben in dieser Population gezeigt werden konnte, wird sie nicht zur Erstlinientherapie empfohlen (Motzer, Penkov et al., 2019).

Für die Kombinationstherapie aus Nivolumab und Ipilimumab im Vergleich mit Sunitinib bei zuvor unbehandelten Patienten mit mittlerem oder hohem Risiko konnte ein Vorteil für das Gesamtüberleben nach 30 Monaten (64% vs. 56%), für das PFS nach 30 Monaten (28% vs. 18%) sowie für die ORR (41% vs. 34%) und die Rate an kompletten Remissionen (11% vs. 2%) gezeigt werden (Motzer, Rini et al., 2019).

Für die Kombinationstherapie aus Pembrolizumab und Axitinib im Vergleich mit Sunitinib bei zuvor unbehandelten Patienten mit mittlerem oder hohem Risiko konnte ein Vorteil für das Gesamtüberleben nach 12 Monaten (87% vs. 71%), für das PFS nach 12 Monaten (56% vs. 40%) sowie für die ORR (56% vs. 30%) gezeigt werden (Rini et al., 2019).

3.8.7.3 Therapieentscheidung nach Beendigung der initialen Therapie

Patienten, die nach initialer Immuntherapie einen Progress ihrer Erkrankung zeigten und zuvor keine antiangiogenetische Therapie erhalten hatten, sollten eine Therapie mit einem VEGFR-Inhibitor erhalten. Mögliche Optionen sind Axitinib, Cabozantinib, Sunitinib und Pazopanib. Falls zuvor keine Exposition gegenüber Ipilimumab stattgefunden hat, kann zudem eine Kombinationstherapie aus Nivolumab und Ipilimumab angeboten werden (Grimm et al., 2019).

Patienten, die nach initialer Kombinationstherapie aus VEGFR-Inhibitor und Immuntherapie einen Progress ihrer Erkrankung vorweisen, können eine Therapie mit einem alternativen VEGFR-Inhibitor, beispielsweise mit Cabozantinib erhalten. Eine Kombination aus Nivolumab und Ipilimumab scheint hier ebenfalls möglich, wobei die Datenlage aktuell für eine solche Empfehlung nicht ausreicht. Diesen Patienten sollte, wenn möglich, eine Teilnahme an klinischen Studien, angeboten werden (McDermott, Lee et al., 2018).

Bei Patienten, welche nach initialer Monotherapie mit einem VEGFR-Inhibitor einen Krankheitsprogress zeigen, ohne zuvor eine Immuntherapie erhalten zu haben, kann eine Behandlung mit Nivolumab durchgeführt werden, welche eine deutliche Verlängerung des Gesamtüberlebens sowie eine Verbesserung der Lebensqualität verglichen mit Everolimus zeigen konnte (Motzer et al., 2015). Eine Kombinationstherapie aus Nivolumab und Ipilimumab kann hier ebenfalls erfolgen, wobei der Evidenzgrad dieser Empfehlung gering ist (Hammers et al., 2017). Bei Patienten, welche ungeeignet für eine Immuntherapie sind, kann die Gabe eines alternativen VEGFR-Inhibitors in Betracht gezogen werden (McDermott, Lee et al., 2018).

4. Zielsetzung

Die Therapie des Nierenzellkarzinoms mit Immuncheckpoint-Inhibitoren zur Blockade des *PD-L1/PD-1-Signalings* stellt eine neue medikamentöse Therapieform dar. Jedoch ist das Ansprechen der Patienten auf diese Therapie sehr heterogen. Die Untersuchung und Identifizierung klinisch nutzbarer prädiktiver Biomarker wäre demnach wünschenswert.

Zu möglichen Kandidaten für Biomarker zählen dabei insbesondere sowohl die Expression von PD-L1 an Tumorzellen als auch die lösliche Form von PD-L1 (sPD-L1), welche im peripheren Blut nachweisbar ist. Die Verbindung zwischen PD-L1 gebildet in Tumorzellen und sPD-L1 im peripheren Blut sowie die Regulation von PD-L1 und sPD-L1 ist jedoch nicht hinreichend verstanden.

In dieser Arbeit sollen daher die folgenden Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Wie wird die Expression und Regulation von PD-L1 durch Zytokine an verschiedenen Zelllinien des Nierenzellkarzinoms beeinflusst?
2. In welcher Verbindung steht die Expression von PD-L1 mit der löslichen Form von sPD-L1 im Zellüberstand?
3. Stehen die sPD-L1 Konzentrationen im Blutserum von Patienten mit Nierentumor in Verbindung mit der Tumorlast?

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde die Expression von PD-L1 auf mRNA- und Proteinebene an vier verschiedenen Zelllinien des Nierenzellkarzinoms untersucht. Dabei wurde insbesondere die Stimulation von PD-L1 durch den bekannten Stimulus IFN- γ getestet. Ferner wurden die Zellüberstände hinsichtlich des Vorhandenseins von sPD-L1 gemessen und getestet, inwiefern ein *knock-down* von PD-L1 mit RNA-Interferenz durch siRNA die Konzentrationen von sPD-L1 im Zellüberstand beeinflusst. Begleitend dazu wurden die sPD-L1-Spiegel von Patienten vor und nach Tumorresektion im Blut gemessen, um mögliche Unterschiede bedingt durch die chirurgische Intervention auf sPD-L1 zu erfassen.

5. Material und Methoden

5.1 Material

Tabelle 8: Geräte und Zubehör

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VX-95	Systec, Dtl.
Brutschrank	Heracell 150i CO2-Inkubator	Thermo Scientific, USA
Eismaschine		Manitowoc, USA
Elektrophoresekammer		
- Agarosegel	Laufkammer 041214	PeqLab, Dtl.
- SDS-Gel	Laufkammer PowerPac Basic	Bio-Rad, USA
ELISA-Reader	EMAX	Molecular Devices, USA
Entwicklungsgerät/Imager	Fluorchem 8900	Alpha Innotec, Dtl.
Feinwaage	Type 1801	Sartorius, Dtl.
Gefriertruhe (-80°C)	HeraFreeze HFU T Series	Thermo Scientific, USA
Heizblock	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Dtl.
Lichtmikroskop	Axiovert 200	Zeiss, Dtl.
Magnetrührer	RCT	IKA, Dtl.
Mikroplattenleser	Dynatech MR 5000	Dynex Technologies, USA
Netzgerät	PowerPac Basic	Bio-Rad, USA
SDS-Gelelektrophorese		
Netzgerät Transfer-Blot	PowerPac HC	Bio-Rad, USA
Neubauer-Zählkammer	Neubauer Improved	Marienfeld GmbH, Dtl.
Photometer	GE Gene Quant 1300	ThermoFisher Scientific, USA
Mikroliterpipetten		
○ Research	2,5; 10; 20; 100; 200; 1000µl	Eppendorf, Dtl.
○ Pipetman	10; 20; 100; 200; 1000µl	Gilson, USA
Pipettierhilfen	Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Dtl.
	Pipetboy 2	Integra, Dtl.
Rollenmischer	CAT RM5	Zipperer, Dtl.
Schüttelplatte	TPM-2	Sarstedt, Dtl.
Thermozykler		
- cDNA	Peltier Thermo Cycler 200	MJ Research, Kanada
- PCR	IQ5 Multicolour RT-PCR-Detection System	Bio-Rad, USA

Transfer-Blot	Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, USA
Ultraschallbad	Bransonic 12	Kobe, USA
Western Blot-System	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad, USA
Zellkulturbank	LaminAir HB 2448	Heraeus, Dtl.
Zentrifugen		
- Tischzentrifuge	Sprout	Biozym Scientific, Dtl.
- Ausschwingzentrifuge	BioFuge Fresco	Heraeus, Dtl.
- Mikroplattenzentrifuge	Universal 320 R	Hettich, Dtl.
- Zellkulturzentrifuge	Labofuge 400R	Heraeus, Dtl.

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Deckgläschen	24 x 60mm	Menzel-Gläser, Dtl.
Einmalhandschuhe	Vasco Nitril White	Braun, Dtl.
Punktionskanülen	MultiFly 21G	Sarstedt, Dtl.
Kryoröhrchen	CryoPure Tube 1,8ml	Sarstedt, Dtl.
Kulturflaschen	25 cm ² ; 75 cm ²	Sarstedt, Dtl.
Pasteurpipetten		Hirschmann Laborgeräte, Dtl.
„PAXgene Blood RNA“-Röhrchen	Blutabnahmeröhrchen, 2,5ml; Bestellnummer 762165	PreAnalytiX, Schweiz
PCR-Mikrotiterplatte	96-Well PCR Platte, randlos	Sarstedt, Dtl.
PCR-Verschlussfolie		PeqLab, Dtl.
Pipettenspitzen		
- mit Filter	2,5µl, 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	StarLab, UK & BioSphere, Italien
- ohne Filter	20µl, 100µl, 200µl	Sarstedt, Dtl.
- ohne Filter	1000µl	Eppendorf, Dtl.
Reaktionsgefäße	0,2ml	Sarstedt, Dtl.
Reaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf, Dtl.
SDS-Gele	Mini Protean TGX Stainfree Gels	Bio-Rad, USA
S-Monovette TM	Röhrchen für Blutabnahme	Sarstedt, Dtl.
Western Blot-Membranen	TransBlot Turbo Transfer Pack	Bio-Rad, USA
Safety-Multifly TM -Kanülen	21G, Kanülen zur Blutabnahme	Sarstedt, Dtl.
Zellschaber	CellScraper	Sarstedt, Dtl.
Zentrifugenröhrchen	15ml, 50ml	Sarstedt, Dtl.

Tabelle 10: Zelllinien, Medium und Antibiotika

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
A-498	ACC 55	DSMZ, Dtl.
CaKi-1	ACC 731	DSMZ, Dtl.
CaKi-2	ACC 054	DSMZ, Dtl.
Cal-54	ACC 365	DSMZ, Dtl.
HepG ₂	ACC 180	DSMZ, Dtl.
FBS (fetales bovines Serum)	P30-8500	PAN Biotech, Dtl.
Glutamin (stabil)	P04-82100	PAN Biotech, Dtl.
PBS (Posphate-buffered Saline w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	PO-36500	PAN Biotech, Dtl.
Penicillin/Streptomycin	P11-010	PAN Biotech, Dtl.
RPMI Medium	RO883	SIGMA
Trypsin/EDTA	P10-023100	PAN Biotech, Dtl.

Tabelle 11: PCR-Primer

Bezeichnung	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
TBP	(+)5'-TCA TGA GGA TAA GAG AGC CAC GAA C-3'	(-)5'-TAG GAA ACT TCA CAT CAC AGC TCC C-3'
PD-L1	(+)5'-GCG AAT TAC TGT GAA AGT CAA TGC C-3'	(-)5'-TGG TCA CAT TGA AAA GCT TACATA CCT C-3'
PD-L1-s	(+)5'-TGT GAC CAG CAC ACT GAG AAT CA-3'	(-)5'-TGG AGG ATG TGC CAG AGG TAG T-3'
PD-L2	(+)5'-CAA TGC ATA ATC ATC TAT GGG GTC G-3'	(-)5'-CAG AAC ACT GGT GAC CTG GTA GAG G-3'
IFNGR1	(+)5'-GAA GGA GTC TTA CAT GTG TGG GGT G-3'	(-)5'-TTA CCA CAG AGA TCA AGG ACT TGG G-3'
IFNGR2	(+)5'-AAA GGA GGA ATC CAA CAG GTC AAA G-3'	(-)5'-ATC AGG ATG ACT TGC TGA AGC TCA G-3'
STAT1	(+)5'-ATG ATG AAC TAG TGG AGT GGA AGC G-3'	(-)5'-CTC TGA ATG AGC TGC TGG AAA AGA C-3'
IRF1	(+)5'-CCA GAT ATC GAG GAG GTG AAA GAC C-3'	(-)5'-ATG TAG CCT GGA ACT GTG TAG CTG C-3'
JAK1	(+)5'-AAG GGC CGC TACAG TCT GCA C-3'	(-)5'-GCT CAT GGG GTA GAC GGG CTG-3'

JAK2	(+)5'-TGA AGA GTA CAA CCT CAG TGG GAC A-3'	(-)5'-AGG CCT CTG TAA TGT TGG TGA GGT-3'
CXCL10	(+)5'-ACG CTG TAC CTG CAT CAG CA-3'	(-)5'-TTC TTG ATG GCC TTC GAT TCT GGA-3'

Alle gelisteten Primer wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen.

Tabelle 12: Antikörper für Western Blot

Antikörper	Ursprungsorganismus	Bestellnummer	Hersteller
PD-L1	Kaninchen	#13684	Cell Signalling Technology Europe, Dtl.
PD-L2	Kaninchen	#82723	Cell Signalling Technology Europe, Dtl.
STAT1	Kaninchen	#9172	Cell Signalling Technology Europe, Dtl.
JAK1	Kaninchen	#3344	Cell Signalling Technology Europe, Dtl.
phospho-JAK1	Kaninchen	#74129	Cell Signalling Technology Europe, Dtl.
IRF1	Kaninchen	#8478	Cell Signalling Technology Europe, Dtl.
JAK2	Kaninchen	#3230	Cell Signalling Technology Europe, Dtl.
phospho-JAK2	Kaninchen	#3771	Cell Signalling Technology Europe, Dtl.
β-Actin	Maus	#MAK6090	Linaris, Dtl.

Tabelle 13: siRNAs

Bezeichnung	siRNA +	siRNA -
si-control	(+)5'- UAA GGC UAU GAA GAG AUA C -3'	(-)5'- GUA UCU CUU CAU AGC CUU A -3'
siPD-1	(+)5'- AGG CGC AGA UCA AAG AGA G -3'	(-)5'-CUC UCU UUG AUC UGC GCC U -3'
si-PD-L1	(+)5'- CCU ACU GGC AUU UGC UGA ACG CAU U -3'	(-)5'-AAU GCG UUC AGC AAA UGC CAG UAG G -3'

Alle gelisteten siRNAs wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen.

Tabelle 14: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Blocking-Puffer (5%-ige Magermilchlösung)	5g Magermilchpulver 100ml 0,1% TBST	
Einfriermedium	20ml RPMI Medium 18ml FBS 3ml DMSO (Dimethylsulfoxid)	
Guanidinhydrochlorid-Waschpuffer	0,3M Guanidine HCl 95% Ethanol in Wasser	
4x Laemmli-Puffer	0,25M Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)-Base 8% SDS 40% Glycerol	
Laemmli-Puffer	Gebrauchslösung	Bio-Rad, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Marker Western Blot	Thermo Scientific Fisher, USA
peqGOLD TriFast™	Gebrauchslösung	PeqLab, Dtl.
RIPA-Puffer	2,2g 150mM NaCl 12,5ml 50mM TRIS-HCl (pH 7,4) 2,5ml 1% v/v Triton X-100 2,5g 1% w/v Natriumdesoxycholat 0,25g 0,1% w/v cSDS 250ml Aqua dest.	
RIPA-Lysepuffer (Proteinisolation)	RIPA-Puffer + 1:25 Complete + 1:10 Phosphostopp	
10x TGS (TRIS, Glycin, SDS)	25mM TRIS-Base 192mM Glycin 0,1% (w/v) SDS	Bio-Rad, USA
10x TBS (TRIS-buffered Saline)	1,4M NaCl 200mM TRIS-Base pH:7,2-7,4	
1x TBST (TRIS-buffered Saline with 0,1% Tween20)	10x Stock 1:10 verdünnt 0,1% Tween20	
TRIS/Glycin/SDS-Puffer	Gebrauchslösung	Bio-Rad, USA

Tabelle 15: Kits und Fertigsysteme

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Human/Cynomolgus Monkey PD-L1/ B7-H1 Quantikine ELISA-Kit	PD-L1 Sandwich ELISA, Bestellnummer: DB7H10	R&D Systems, USA
PAXgene-Blood-miRNA-Kit	RNA-Extraktion aus Vollblut, Bestellnummer: 763134	PreAnalytiX, Schweiz
Pierce™-BCA Protein-Assay-Kit	Konzentrationsbestimmung von Proteinproben	Thermo Scientific Fisher, USA
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Reverse Transkription von mRNA in cDNA: <ul style="list-style-type: none"> - 5x Reaction Puffer - RiboLock™ RNase Inhibitor - RevertAid™ RT - Random Hexamer Primer - DNase I, RNase-free - 10mM dNTP-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 	Thermo Scientific Fisher, USA
SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate	Entwicklerlösung für Imagersystem: <ul style="list-style-type: none"> - West Pico Luminol Enhancer Solution - West Pico Stable Peroxid Solution 	Thermo Scientific Fisher, USA

Tabelle 16: Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Aqua dest.	B. Braun, Dtl.
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Dtl.
BSA (engl.: bovine serum albumine)	Carl Roth, Dtl.
Chloroform	Carl Roth, Dtl.
DNase I	Roche, Schweiz
Ethanol	Carl Roth, Dtl.
Glycin	Carl Roth, Dtl.
Guanidinhydrochlorid	Carl Roth, Dtl.
HCl 6M (Salzsäure)	AppliChem, USA
Interferon-γ #285-IF-100	R&D Systems, USA
Interleukin-2 #202-IL-010	R&D Systems, USA
Interleukin-6 #285-IF-100	R&D Systems, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, USA
Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent	Thermo Scientific Fisher, USA

Magermilchpulver	Carl Roth, Dtl.
NaCl (Natriumchlorid)	AppliChem, USA
NaCl, isoton 0,9% (Natriumchlorid)	B. Braun, Dtl.
Opti-MEM I Reduced Serum Media	Thermo Scientific Fisher, USA
Protease-Inhibitor (Complete)	Roche, Schweiz
SDS-Gele (4-20% MiniProtean TGA Stain-Free Gel)	Bio-Rad, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth, Dtl.
SYBR Green Fluoreszenz Mix	Thermo Scientific Fisher, USA
TRIS-Base	Carl Roth, Dtl.
TRIS-HCl	Carl Roth, Dtl.
Tween 20	Carl Roth, Dtl.

Tabelle 17: Software

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
AlphaEaseFC	Gel-, Membran- und Immunoblot-dokumentation	Alpha Innotech, USA
Bio-Rad IQ5	PCR-Software	Bio-Rad, USA
GraphPad Prism 8	Graphenerstellung	GraphPad Software, Inc., USA
Microsoft 365 Word	Textverarbeitung	Microsoft, USA
Microsoft 365 Excel	Tabellenarbeit	Microsoft, USA
Microsoft 365 PowerPoint	Abbildungsbearbeitung	Microsoft, USA
SoftMax Pro	ElisaReader, BCA-Assay	Molecular Devices, USA

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

5.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Die zytogenetischen Expressionsanalysen und Versuche in dieser Arbeit wurden an den RCC-Zelllinien CaKi-1, CaKi-2, A-498 und Cal-54 sowie an der hepatozellulären Karzinom-Zelllinie (HCC, engl.: hepatocellular carcinoma) HepG₂ durchgeführt (Tab. 18). Während die Zelllinien CaKi-1 und A-498 auf Grund von expressionsbasierter Klassifikation dem ccRCC zugeordnet werden können, konnte CaKi-2 als ccRCC ausgeschlossen werden (Sinha et al., 2017; Brodaczewska et al., 2016). Stattdessen ließ sich die Zelllinie CaKi-2 auf Grund von hohen Expressionsspiegeln von c-MET und LRRK2 (engl.: leucine-rich repeat kinase-2) als pRCC-Zelllinie klassifizieren (Looyenga et al., 2011). In Genexpressionsanalysen von pRCCs konnte das vermehrte Auftreten von Aberrationen von Chromosom 8 und der Aktivierung des MYC-Signalwegs nachgewiesen werden, was gleichermaßen für in Zellkultur gewachsene CaKi-2-Zellen gelang (Furge et al., 2007). Histologische Untersuchungen von auf Mäusen übertragenen CaKi-2 Zellen zeigten ebenfalls ein papilläres Wachstumsmuster (Pulkkanen et al., 2001). Die Zuordnung der Zelllinie Cal-54 zu einem histologischen Subtyp kann nicht mit abschließender Sicherheit erfolgen. Sie weist eine Vermehrung der Kopienanzahl für diverse typische RCC-Gene auf, welche am ehesten typisch für pRCCs sind. Trotz dessen gilt sie als unbestimmte RCC-Zelllinie (Sinha et al., 2017).

Tabelle 18: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Alter	Geschlecht, Herkunft	Gewebe	Histologie
Caki-1	49	♂, kaukasisch	Niere; gewonnen aus einer Hautmetastase	ccRCC
Caki-2	69	♂, kaukasisch	Niere; gewonnen aus dem Primärtumor	pRCC
A-498	52	♂, kaukasisch	Niere; gewonnen aus dem Primärtumor	ccRCC
Cal-54	75	♂, kaukasisch	Niere; gewonnen aus malignem Pleuraerguss	unbestimmt
HepG ₂	15	♂, kaukasisch	Leber; gewonnen aus dem Primärtumor	HCC

5.2.1.2 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Bebrütung der Zellen erfolgte im Inkubator „HeraCell™“, in dem die Temperatur durchgehend bei 37,0°C lag. Es herrschte eine vollständige Wasserdampfsättigung sowie eine CO₂-Konzentration von 5%. Alle Versuche und Arbeiten an den Zellen wurden an der Zellkulturbank „LaminAir HB 2448™“ durchgeführt. Es wurden ausschließlich sterile Medien, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien verwendet. Alle Reaktionsgefäße wurden zuvor autoklaviert. Ein kontinuierlicher Luftstrom verhinderte eine Kontamination der Arbeitsflächen. Alle Oberflächen wurden sowohl vor als auch nach der Benutzung mit einer 70-prozentigen Ethanol-Lösung wischdesinfiziert. Alle Kulturmedien und Reagenzien wurden gemäß den Vorgaben des jeweiligen Herstellers gelagert. Vor Kontakt mit den Zellen wurden sie, falls nicht explizit anders erwähnt, in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Kultivierung der Zellen wurde in Kulturflaschen mit 25 cm² Grundfläche durchgeführt, in die 5ml Nährlösung gegeben wurden. Diese Nährlösung enthielt das Nährmedium RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), dem 10% fetales bovines Serum, 1% stabiles L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurden. Eine Ausnahme bildet die Nährlösung für die Zellen Caki-1, welche in Vorversuchen ein deutlich schnelleres Wachstum nach Zusatz von 20% fetalem bovinen Serum gezeigt hatten, weshalb dies zur Kultivierung und für die Versuche beibehalten wurde. Alle zwei bis drei Tage wurde das alte Medium aus den Kulturflaschen abgesaugt, die Zellen mittels phospatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, engl.: phosphate-buffered saline) gewaschen und anschließend 6ml neues Medium hinzugegeben. Das Passagieren der Zellen in neue Kulturflaschen erfolgte spätestens, sobald die Zellen in der regelmäßigen durchlichtmikroskopischen Beurteilung eine Konfluenz von 90% erreicht hatten.

5.2.1.2 Passagieren der Zellen

Um die Zellen zu splitten oder für Versuche verwenden zu können, wurden die Zellen, nach Absaugen des alten Nährmediums und anschließendem Waschen der Zellen mit PBS, enzymatisch von der Wachstums Oberfläche der Zellkulturflaschen abgelöst. Hierzu wurde 2ml Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat) in die Kulturflaschen hinzugegeben und die Zellen anschließend für 5 Minuten im „HeraCell™“ Brutschrank inkubiert. Zeigte sich daraufhin in der Durchlichtmikroskopie eine vollständige Ablösung der Zellen, wurde die Trypsinaktivität durch die Zugabe von 5ml Nährlösung zur Trypsin-Zell-Suspension gestoppt. Diese Suspension wurde dann in ein 15ml Fläschchen überführt und für 5 Minuten bei 1.400 Umdrehungen pro Minute (RPM, engl.: rounds per minute) bei Raumtemperatur in der „Labofuge™ 400R“ zentrifugiert. Nach der Zentrifugation entstand ein Zellpellet, welches nach Absaugen des Überstandes aus dem 15ml-Fläschchen mit der Pasteurpipette mit Nährlösung resuspendiert werden konnte. Je nach benötigter Menge konnte diese Suspension nun in neue Kulturflaschen pipettiert werden. Anschließend wurde die Suspension in jeder Kulturflasche mit Nährlösung auf 5ml aufgefüllt. Diese Passage wurde maximal 30-mal pro Zelllinie in Kultur durchgeführt. Sobald diese Anzahl an Passagen erreicht wurde, wurden die Zellen verworfen und es wurden neue, zuvor in flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellen verwendet. Nach schnellem Auftauen unter warmen Wasser wurden

die in Dimethylsulfoxid (DMSO) suspendierten Zellen zügig mit Nährlösung verdünnt, abzentrifugiert und auf neue Kulturflaschen verteilt. Wurden die Zellen für Versuche benötigt, wurde vor dem Übertragen der Zellsuspension in die neuen Kulturflaschen eine Auszählung der Zellen durchgeführt, um eine gleiche Anzahl an Zellen in jeder Kulturflasche zu gewährleisten. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und nach dem Auszählen der äußeren vier Quadranten der Zählkammer der Zellgehalt pro ml Suspension nach folgender Formel berechnet, welche sich aus der Geometrie der Zählkammer ergibt:

$$\frac{\text{Zellzahl aller Quadrate}}{4} \times 10.000 = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml Suspension}}$$

Durch den erhaltenen Wert ergab sich das Volumen an Suspension, das für den Erhalt einer bestimmten Zellzahl für den jeweiligen Versuch benötigt wurde:

$$\frac{\text{Benötigte Zellzahl}}{\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml Suspension}}} = \text{benötigtes Volumen Zellsuspension in ml}$$

5.2.1.3 Behandlung der Zellen mit Interferon-γ, Interleukin-2 und Interleukin-6

In einigen Zellversuchen wurde bei Versuchsbeginn dem Nährmedium in der Kulturflasche IFN- γ (10 ng/ml) und IL-2 (10 ng/ml) sowie IL-6 (25 ng/ml) - entweder gemeinsam oder jeweils einzeln - zugegeben, um die Auswirkung auf die Expression verschiedener Zielproteine zu untersuchen. Hierzu wurden die Substanzen stets in einer Verdünnung von 1:1000 im Verhältnis zum Nährmedium hinzugefügt.

5.2.1.4 RNA-Interferenz mittels siRNA

Die RNA-Interferenz ist ein natürlich vorkommender Mechanismus, welcher der zielgerichteten Abschaltung bestimmter Gene dient. Er beruht auf einer Wechselwirkung kurzer Stücke RNA mit der für ein bestimmtes Protein kodierenden mRNA, welche zu einer Spaltung der mRNA in mehrere Fragmente führt. In der Folge wird die normale Funktion der mRNA unterbunden und die Translation in ein Protein verhindert. Dieses Prinzip lässt sich experimentell durch Zugabe synthetisch hergestellter siRNAs (engl.: small interfering RNAs) nutzen, um Gene zielgerichtet stillzulegen („Gen-Knock-down“). Durch die gezielte Blockade eines Gens kann dann beispielsweise die Funktion des von ihm kodierten Proteins abgeleitet werden. Umgekehrt kann auch bei bekannter Funktion oder bei einem bestimmten Merkmal mit Hilfe von siRNA nach dem verantwortlichen Gen oder Protein gesucht werden.

Die Transfektion, das Einbringen von Fremd-RNA und in diesem Fall siRNA in eine Zielzelle, erfolgte durch Lipofektion. Bei der Lipofektion wird die siRNA in Liposomen eingeschlossen. Nach der Endocytose der Liposomen fusionieren diese mit der Endosomenmembran und die siRNA wird in die Zelle aufgenommen und kann sich mit der mRNA verbinden.

Die Transfektion wurde hier mit der Reagenz „Lipofectamine RNAiMAX“ von Thermo Scientific Fisher durchgeführt. Lipofectamine ist eine gängige Transfektionsreagenz, welche kationische Liposomen enthält, die negativ geladene siRNAs aufnehmen können. Die weiterhin an ihrer Oberfläche positiv geladenen Liposomen können nun mit der negativ geladenen Zellmembran lebender Zellen fusionieren. Da in Anwesenheit von Serum die Transfektion weniger effektiv abläuft, wurde die Menge an zugesetztem Nährmedium (mit Serum) für Versuche, in denen eine Transfektion durchgeführt wurde, von 5ml auf 3,2ml reduziert. Zu diesen 3,2ml wurden 800µl Transfektionsansatz hinzugegeben, welcher zu großen Teilen Opti-MEM I (Serum-reduziertes Medium) enthielt.

Um die Transfektion zu beginnen, mussten die Zellen eine Konfluenz von etwa 60-80% aufweisen. Es wurden zunächst in einem 1,5ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß 396µl Opti-MEM mit 4µl der jeweiligen siRNA vermischt. In einem zweiten 1,5ml Mikroreaktionsgefäß wurden 392µl Opti-MEM mit 8µl RNAiMAX vermischt. Anschließend wurden die Inhalte beider Gefäße in eines zusammengeführt, auf dem Vortexer gut vermischt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Währenddessen wurde das gebrauchte Nährmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und diese mit 3,2ml frischem Medium wie oben beschrieben aufgefüllt. Nach Ablauf der Inkubationsdauer konnte der Transfektionsansatz zu den Zellen in die Kulturflasche hinzugefügt werden. Als Negativkontrolle wurde in eine Kulturflasche lediglich 800µl Opti-MEM zum Serum enthaltenden Nährmedium hinzugefügt. Die Versuche, in denen eine Transfektion durchgeführt wurde, dauerten 48 Stunden und wurden nach Erreichen dieses Zeitintervalls wie unten beschrieben beendet.

5.2.2 Quantitative real-time PCR

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (rt-PCR, engl.: real-time polymerase chain reaction) ermöglicht es, durch die Amplifikation auch kleinster Mengen an Genmaterial verlässliche Aussagen über den Expressionsstatus von mRNA (engl.: messenger RNA) zu treffen. Als Ausgangsmaterial für die rt-PCR wird DNA benötigt, welche durch reverse Transkription aus der in unserem Fall zu untersuchenden RNA gewonnen werden kann. Die einzelnen Schritte von der Gewinnung des Ausgangsmaterials, der RNA, aus den verschiedenen in der Zellkultur durchgeführten Versuchen bis zur Auswertung der durch die quantitativen rt-PCR erhaltenen Daten werden im Folgenden erläutert.

5.2.2.1 RNA-Isolation

Nachdem die zuvor festgelegte Inkubationsdauer im jeweiligen Zellversuch erreicht worden war, wurde der Versuch beendet, indem die Stoffwechselprozesse und Enzymaktivitäten durch Lyse der Zellen mit Hilfe der Phenol-Extraktionsmethode gestoppt wurden (Chomczynski & Sacchi, 1987). Bei diesem Verfahren kommt es nach Zugabe eines Gemischs aus Guanidiniosthiocyanat und Phenol zur Bildung von drei Phasen, wobei die obere wässrige Phase vornehmlich RNA enthält, die mittlere Phase aus DNA besteht und die untere hydrophobe Phase hauptsächlich aus Proteinen besteht. Zur Durchführung dieser Methode wurde die Fertiglösung „peqGOLD TriFast™“ verwendet. Von dieser Lösung wurde, nach

Asservierung von 1ml Nährlösungsüberstand aus der Zellkulturflasche und anschließendem Absaugen des restlichen Nährmediums, 1ml auf die adhärent wachsenden Zellen gegeben. Daraufhin ließen sich die Zellen mittels Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche ablösen und mit der Fertiglösung zu einer einheitlichen Suspension homogenisieren. Die Zell-TriFast-Suspension wurde nun in 1,5ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße überführt und zur direkten Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt.

Zur Extraktion der RNA wurden nun 20% des Volumens an Chloroform zur Zell-TriFast-Suspension hinzugegeben, die Reagenzien gut miteinander vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden nach der Inkubation für 10 Minuten bei 13.000 RPM und 4°C in der „Bio-Fuge Fresco“ zentrifugiert, woraufhin sich die oben bereits beschriebenen drei Phasen aus RNA, DNA und Proteinen bildeten. Die obere wässrige RNA-Phase wurde nun in ein neues 1,5ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Die mittlere DNA-Phase wurde verworfen und die verbliebene Proteinphase zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

Zu der entstandenen RNA-Lösung wurde nun das gleiche Volumen an -20°C kaltem Isopropanol gegeben und das Gemisch für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die nun ausfällende RNA konnte durch wiederholte Zentrifugation mit den oben genannten Einstellungen der Zentrifuge am Boden des Mikroreaktionsgefäßes gesammelt werden. Nach Abkippen der Flüssigkeit wurde das RNA-Pellet gewaschen, indem 400µl -20°C kaltes 70-prozentiges Ethanol in das Reaktionsgefäß gegeben, das Pellet im Ethanol geschwenkt und anschließend eine erneute Zentrifugation mit den oben genannten Parametern durchgeführt wurde. Dieser Schritt wurde zweimalig wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Ethanol abgegossen und das Pellet für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur im Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wurde daraufhin mit 35µl Aqua dest. resuspendiert und bei -20° gelagert, eine weitere Bearbeitung der Probe erfolgte frühestens 12 Stunden später.

5.2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Für eine möglichst exakte Vergleichbarkeit der Ergebnisse der rt-PCR muss stets die gleiche Menge mRNA in cDNA (engl.: complementary DNA) transkribiert werden. Da die zuvor gewonnen Proben einen unterschiedlichen RNA-Gehalt aufwiesen, wurde eine photometrische Messung des RNA-Gehalts durchgeführt.

Alle Arbeitsgeräte und -flächen wurden zunächst mit 70-prozentiger Ethanollösung wischdesinfiziert und eine potentiell vorhandene Kontamination mit RNase mit 30-prozentigem Wasserstoffperoxid beseitigt. Das Wasserstoffperoxid wurde dann mit Aqua dest. abgewaschen. Die RNA-Proben wurden langsam auf Eis abgetaut und während der gesamten Messung auf Eis gelagert. Das Photometer wurde während des Abtauens mit 70µl Aqua dest. kalibriert. Zur Messung der Proben wurden diese jeweils im Verhältnis 1:35 verdünnt, zu 2µl RNA-Probenmaterial wurden 68µl Aqua dest. in ein 200µl Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß gegeben und miteinander vermischt.

Die photometrische Messung der Absorption der hergestellten Lösung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260nm, dem Absorptionsmaximum von RNA (Chomczynski & Sacchi, 2006). Die RNA-Konzentration in $\frac{\mu g}{\mu l}$ wurde durch das Photometer berechnet, wobei eine Konzentration von $40 \frac{\mu g}{\mu l}$ einer optischen Dichte von 1 entsprach. Die Reinheit der verwendeten RNA-Proben wurde überprüft, indem zusätzlich die Absorption bei einer Wellenlänge von 280nm gemessen wurde, da eine vermehrte Absorption in diesem Bereich auf eine Kontamination der Probe mit Phenol oder Protein schließen lässt. Ein Reinheitsquotient von $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ wurde im Bereich von 1,6-2,0 akzeptiert. Nach Durchführung der Messung wurden die Proben entweder direkt in cDNA transkribiert oder wieder bei -20°C gelagert.

5.2.2.3 Reverse Transkription der mRNA in cDNA

Wie oben bereits erwähnt, wird für die Durchführung einer quantitativen rt-PCR DNA als Ausgangsmaterial benötigt, weswegen die isolierte mRNA in DNA umgeschrieben werden muss. Die zu einem RNA-Strang komplementäre DNA wird als cDNA bezeichnet und kann mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase (rT), welches physiologisch bei Retroviren vorkommt, aus RNA synthetisiert werden (Wu, A. M. et al, 1975).

Zunächst erfolgte die Reinigung des Arbeitsplatzes und das Auftauen der RNA-Proben wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Durch die zuvor gemessene RNA-Konzentration in der jeweiligen Probe konnte mit Hilfe der untenstehenden Formel das Volumen an RNA-Lösung errechnet werden, welches genau 1µg RNA enthält:

$$\text{benötigtes Probenvolumen in } \mu l = \frac{1 \mu g}{\text{RNA - Konzentration der Probe in } \frac{\mu g}{\mu l}}$$

Das errechnete Probenvolumen wurde zusammen mit 1µl DNase in ein 200µl Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß gegeben und auf 11,5µl mit Aqua dest. aufgefüllt. Die DNase dient hierbei dazu, etwaige bei der Isolation mitgeführte Verunreinigungen mit genomischer DNA aufzulösen. Zusätzlich zu den zu untersuchenden RNA-Proben wurden zwei Negativkontrollproben erstellt, wobei eine aus 10,5µl Aqua dest. und 1µl DNase bestand, um eine Verunreinigung des genutzten Aqua dest. mit RNA detektieren zu können. Diese wird im Folgenden als H₂O-Kontrolle bezeichnet. Die zweite Kontrolle enthielt 1µl RNA aus jeder zu transkribierenden Probe und 1µl DNase, wenn bis zu 8 Proben untersucht wurden, oder 0,5µl RNA aus jeder Probe sowie 1µl DNase, wenn mehr als 8 Proben untersucht wurden. Die zweite Kontrolle wurde dann mit Aqua dest. auf 12,5µl aufgefüllt, im weiteren Verlauf wurde ihr keine rT hinzugefügt, um Verunreinigungen mit DNA in den RNA-Proben selbst feststellen zu können. Diese Kontrolle wird als rT-min Kontrolle bezeichnet.

Die so vorbereiteten Proben wurden in den Thermocycler gegeben, in dem die DNase Reaktion bei 37°C innerhalb von 30 Minuten erfolgte. Es folgte eine 5 Minuten andauernde Inaktivierungsphase der DNase

bei 75°C. Anschließend wurde zu jeder Probe 1µl Random-Hexamer-Primer gegeben, welcher aus zufällig synthetisierten Oligonukleotiden besteht.

Die reverse Transkription erfolgt nun nach Zugabe einer Mischung aus 1µl rT, 2µl dNTP-Mix (Desoxyribonukleosidtriphosphat), 0,5µl Ribo-Lock RNase-Inhibitor und 5x rT-Puffer zu jeder Probe. Der rT-min Kontrolle wurde keine rT hinzugefügt. Der Puffer dient der Gewährleistung eines optimalen pH-Wertes und einer optimalen Ionenkonzentration für die rT, der RNase-Inhibitor verhindert einen vorzeitigen Abbau der RNA und eine damit einhergehende unvollständige Transkription, die dNTPs bilden die Baustoffe für die zu synthetisierende DNA.

Die Reaktion erfolgte im Thermocycler. Zunächst lagern sich im ersten Inkubationsschritt von 10 Minuten bei 25°C die Primer an zufällige RNA-Sequenzen an und bilden so den Ansatzpunkt für eine möglichst vollständige Synthese des cDNA-Strangs durch die rT. Daraufhin erfolgt die eigentliche reverse Transkription bei 42°C für 60 Minuten, an die sich eine 10 Minuten andauernde Denaturierung der rT bei 70°C anschloss. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend bei -20°C gelagert oder direkt für die rt-PCR verwendet.

5.2.2.4 Durchführung der PCR

In der quantitativen rt-PCR wird eine zu untersuchende Region der cDNA durch Zugabe von spezifischen Primern markiert und in den darauffolgenden Schritten amplifiziert. Die cDNA-Doppelstränge müssen zunächst durch Hitzeeinwirkung voneinander getrennt werden. Durch Zugabe von genomischen dNTPs sowie einer hitzestabilen, DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) können zu den entstandenen Einzelsträngen komplementäre DNA-Stränge synthetisiert werden. Durch periodische Temperaturwechsel gelingt nun die Trennung der neusynthetisierten DNA-Stränge, die erneute Anlage von Primern und daraufhin eine wiederholte Synthese von komplementären DNA-Strängen. Dabei verdoppelt sich in jedem Zyklus die Menge replizierter DNA, welche nach jedem Schritt, in Echtzeit, gemessen und quantifiziert werden kann. Hierzu wurde in dieser Arbeit der Fluoreszenzfarbstoff „SYBR Green I“ verwendet, der in doppelsträngiger DNA interkaliert. Er absorbiert Licht in einer Wellenlänge von 494nm und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 521nm. Je mehr repliziertes Genmaterial vorhanden ist, desto stärker ist das gemessene Fluoreszenzsignal. Anhand der Anzahl an Replikationszyklen, die benötigt wird, um ein entsprechend starkes Fluoreszenzsignal zu erhalten, kann auf die ursprüngliche Menge an cDNA geschlossen werden, denn je weniger Zyklen dafür benötigt werden, desto mehr cDNA war zu Beginn der PCR vorhanden (VanGuilder et al., 2008).

Die Arbeitsfläche wurde zunächst gereinigt. Anschließend wurde für jeden Primer ein PCR-Ansatz in einem 1,5ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß hergestellt, welcher aus 11µl Aqua dest., 12,5µl SYBR Green Fluorescein Mix, 0,25µl Vorwärts- und 0,25µl Rückwärtsprimer für jede zu untersuchende Probe und jede Negativkontrolle bestand. Dieser PCR-Ansatz wurde gut vermischt und in eine 96-Well PCR-Platte pipettiert, wobei in jedes Well 24µl des Ansatzes gegeben wurden. Zu diesen 24µl wurde 1µl der entsprechenden cDNA-Probe beziehungsweise der Negativkontrolle gegeben, sodass jedes Well 25µl

enthielt, woraufhin die PCR-Platte mit selbstklebender Kunststoffolie versiegelt wurde. Die PCR-Platte wurde sodann in der „Universal 320R“-Mikroplattenzentrifuge für 2 Minuten bei 1.200 RPM bei Raumtemperatur zentrifugiert, um den Inhalt der Wells an den Boden dieser zu verlagern.

Die PCR-Platte wurde daraufhin in den PCR-Cycler „iQ5“ gegeben, um die eigentliche Reaktion durchzuführen. Die Steuerung und Auswertung der verschiedenen Zyklen wurde dabei mit dem zugehörigen Computerprogramm „Bio-Rad iQ5 – Standard Edition“ durchgeführt, dies geschah nach folgendem Schema (Tab. 19):

Tabelle 19: Ablaufschema PCR

Zyklus 1	1x	
15 Minuten	95°C	Trennung der DNA-Doppelstränge
Zyklus 2	45x	
15 Sekunden	95°C	Trennung der DNA-Doppelstränge
15 Sekunden	58°C	Synthese komplementärer DNA-Stränge
30 Sekunden	72°C	Fluoreszenzmessung
Zyklus 3	81x	
10 Sekunden	55°C (+0,5°C-Inkrement bis 95°C)	Schmelzkurvenmessung

Die PCR-Platte wurde im Anschluss aus dem PCR-Cycler entnommen und bei -20°C eingefroren. Durch Überprüfung der erhaltenen Schmelzkurven (MC, engl.: melting curve) ließ sich ermitteln, ob tatsächlich das gewünschte Genmaterial vervielfältigt wurde. Da die MC für jedes Gen auf Grund von verschiedenen Basenzusammensetzungen und deren Länge charakteristisch ist, kann ein Unterschied in der emittierten Fluoreszenz nach Denaturierung des cDNA-Doppelstrangs zu Einzelsträngen bei jeweils typischen Temperaturen gemessen werden. So ist es möglich, eine MC mit temperaturabhängigem Fluoreszenzmaximum zu generieren, um diese mit der vom Hersteller angegebenen Referenz-MC des jeweiligen Primers zu vergleichen. Sofern sie miteinander übereinstimmen, war davon auszugehen, dass das korrekte Genmaterial amplifiziert wurde.

5.2.2.5 Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der quantitativen rt-PCR erfolgt durch Betrachtung sogenannter Schwellenwertzyklen (Ct-Wert, engl.: cycle threshold). Der Ct-Wert gibt an, nach wie vielen Replikationszyklen ein Fluoreszenzsignal detektiert werden konnte, das signifikant über dem gemessenen Hintergrundsignal, dem Schwellenwert, lag. Je mehr Ausgangs-cDNA des gesuchten Genabschnitts vorhanden war, desto weniger Replikationszyklen wurden benötigt, um diesen Schwellenwert zu überschreiten und dementsprechend niedriger war der Ct-Wert für dieses Gen. Um diesem Wert Aussagekraft zu verleihen, wird er in Relation zu den Ct-Werten sogenannter Housekeeping-Gene gesetzt und die Differenz aus diesen Ct-Werten gebildet. Housekeeping-Gene kodieren für Proteine, welche oft eine zentrale Position in einzelnen Prozessen des Zellstoffwechsels einnehmen. Auf Grund dessen werden sie weitestgehend unabhängig von äußeren Einflussfaktoren und jederzeit in relativ ähnlichen Mengen exprimiert, was sich in reproduzierbaren Ct-Werten in der quantitativen rt-PCR äußert. Bereits kleinere Unregelmäßigkeiten, wie zu hohe oder zu geringe Mengen an cDNA oder Schwankungen in der Menge an verwendetem PCR-Ansatz, würden zu Veränderungen in den Ct-Werten der Housekeeping-Gene führen und in gleichem Maße auch die Ct-Werte der eigentlich zu untersuchenden Gene beeinflussen. Bildet man nun den sogenannten Δ Ct-Wert, die Differenz aus Ct-Wert der Probe und Ct-Wert des Housekeeping-Gens, können diese Veränderungen minimiert werden:

$$\Delta Ct = Ct(\text{Probe}) - Ct(\text{Housekeeping})$$

Auch für den Δ Ct-Wert gilt, dass er umso kleiner wird, je mehr Ausgangs-cDNA des gesuchten Gens vorhanden war. Alternativ zum Δ Ct-Wert kann der $-\Delta$ Ct-Wert verwendet werden, der intuitiv verständlicher ist (VanGuilder et al., 2008):

$$-\Delta Ct = Ct(\text{Housekeeping}) - Ct(\text{Probe})$$

Als Housekeeping-Gen wurde in dieser Arbeit TBP (engl.: TATA-binding protein) verwendet. Veränderungen in den exprimierten RNA-Spiegeln zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe werden als $\Delta\Delta$ Ct-Werte angegeben.

5.2.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine etablierte Methode zum spezifischen Nachweis von Proteinen, welche auf ein Gel übertragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen werden. Die Proteine werden dann durch spezifische Antikörper markiert und können schließlich durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Verfahren zur Isolation der Proteinproben verwendet, da PD-L1 nach Isolation mit TriFast nur in fälschlicherweise zu

geringen Mengen auf der Membran nachgewiesen werden konnte. Nach Isolation mittels Radioimmunpräzipitationsassaypuffer (RIPA, engl.: radioimmunoprecipitation assay) gelang dies deutlich besser. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte von der Probenisolation bis zur Antikörperdetektion beschrieben.

5.2.3.1 Proteinisolation mit TriFast

Wie zuvor beschrieben wurden nach Zugabe der „peqGOLD TriFast™“ Fertiglösung die Proteinphase abpipettiert und bei -20°C gelagert. Zur Isolation der Proteinproben zur weiteren Verwendung wurde dieses TriFast-Lysat aufgetaut und es wurden 30% des Volumens an 100-prozentigem Ethanol hinzugegeben, beides gut miteinander vermischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden die Proben bei 5.500 RPM (2.000g) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss in neue 2ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäße überführt, mit 1.300µl 100-prozentigem Isopropanol vermischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 10 Minuten bei 13.000 RPM und 4°C. Der Überstand wurde daraufhin vorsichtig abgekippt, das verbliebene Pellet mit 2ml 0,3M Guanidinium-Hydrochlorid in 95-prozentigem Ethanol gewaschen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 11.300 RPM bei 4°C zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt 4-mal wiederholt. Nach der letzten Wiederholung wurden die Proben ein letztes Mal mit 2ml 100-prozentigem Ethanol gewaschen, für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut für 5 Minuten bei 11.300 RPM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde nun vollständig verworfen und das im Mikroreaktionsgefäß verbliebene Pellet für 15 Minuten unter Raumluft getrocknet. Je nach Größe des Pellets erfolgte die Zugabe von 100-150µl 1x Laemmli-Puffer. In dieser Pufferlösung wurde das Pellet nun mit Stößel und Schere grob zerkleinert, um die restlichen verbliebenen Pellet-Reste abschließend im Ultraschallbad für mindestens 15 Minuten aufzulösen, bis eine klare Proteinlösung entstand. Die so gewonnenen isolierten Proteinproben wurden dann bei -20°C eingelagert.

5.2.3.2 Proteinisolation mit RIPA

Da sich in Vorversuchen zeigte, dass bei einigen Zelllinien im Western Blot die tatsächliche Menge an PD-L1 nach Probenisolation mit Hilfe der oben beschriebenen TriFast-Lösung nicht korrekt zur Darstellung kam, wurden einige der Versuche wiederholt, jedoch nicht durch Hinzugabe der TriFast-Lösung beendet, sondern nach unten genanntem Ablauf mit Hilfe von RIPA-Puffer gestoppt. Hierdurch konnten zwar die Proteinbanden im Western Blot korrekt dargestellt werden, jedoch ist es mit dieser Isolationsmethode nicht möglich, gleichzeitig RNA aus den Proben zu gewinnen.

Nachdem die zuvor festgelegte Inkubationsdauer im jeweiligen Zellversuch erreicht worden war, erfolgte die Asservierung von 1ml Nährlösungsüberstand aus der Zellkulturflasche. Das restliche Nährmedium wurde mit der Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen anschließend mit 5ml eiskaltem PBS gewaschen. Das PBS wurde daraufhin abgesaugt und erneut 1ml eiskaltes PBS zu den Zellen gegeben.

und die Zellen wurden mittels Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die in PBS gelösten Zellen wurden dann in ein 15ml Fläschchen überführt und bei 1.200 RPM bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet je nach Größe mit 100-180µl RIPA-Arbeitslösung resuspendiert, das Pellet mit der Pipettenspitze zerstoßen und die Suspension in ein 1,5ml Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß überführt.

Die Mikroreaktionsgefäße wurden daraufhin für 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei alle 10 Minuten auf dem Vortexer geschüttelt. Anschließend wurden die Proben für 30 Minuten bei 13.000 RPM und bei 4°C zentrifugiert, die Überstände, welche die lysierten Proteine enthielten, in neue Mikroreaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Die verbliebenen Pellets wurden verworfen.

5.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um den Proteingehalt der gewonnenen Zelllysate zu ermitteln, wurde ein Bicinchoninsäure-Protein-Assay (BCA-Assay, engl.: bicinchonin acid assay) durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration gewährleistet, dass in den folgenden quali- und quantitativen Immunoblots immer die gleiche Menge an Protein auf die jeweilige Membran aufgetragen wird, woraus eine bessere interexperimentelle Vergleichbarkeit der Ergebnisse resultiert.

Das Prinzip des BCA-Assays beruht auf einer Kombination der Biuret-Reaktion mit der hochsensitiven kolorimetrischen Bestimmung einwertiger Kupferionen über BCA. In alkalischem Milieu erfolgt die Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{+} -Ionen über die Bildung eines Chelatkomplexes mit Peptiden, welche aus mehr als 3 Aminosäureresten bestehen (Biuret-Reaktion; Gornall et al., 1949). Diese Reduktion erfolgt primär über die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tyrosin und Tryptophan. Im Anschluss bildet ein Cu^{+} -Ion mit 2 BCA-Molekülen einen intensiv violett gefärbten, wasserlöslichen Chelatkomplex, welcher ein Absorptionsmaximum von 562nm besitzt. Die hier gemessene Absorption verhält sich proportional zur Proteinkonzentration.

Das verwendete „Pierce™“-BCA-Protein-Assay-Kit enthält eine Reagenz A, welche unter anderem aus Bicinchoninsäure, Natriumhydroxid, Natriumkarbonat und Natriumbikarbonat besteht, sowie eine Reagenz B, welche 4% Kupfersulfat enthält, womit alle nötigen Komponenten für die oben beschriebene Reaktion vorhanden sind. Um den Rückschluss von gemessenen Absorptionen auf Proteinkonzentrationen zu ermöglichen, wurden die Absorptionen von BSA-Standards (bovines Serumalbumin) mit bekannten Proteinkonzentrationen gemessen und so eine Standardkurve erstellt. Durch den Vergleich der gemessenen Absorption der unbekannten Probe mit dieser Standardkurve konnten nun die jeweiligen Proteinkonzentrationen berechnet werden.

Zur Bestimmung der Konzentration wurden 12,5µl der unterschiedlich konzentrierten BSA-Standardproben (2000µg/ml, 1500µg/ml, 1000µg/ml, 750µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 62,5µg/ml, 25µg/ml, 0µg/ml), die in 1:10 in Aqua dest. verdünnten Proteinproben und die Leerproben (1:10 in Aqua dest. verdünnter, 1x Laemmli-Puffer) zur Background-Normalisierung jeweils doppelt auf eine 96-Well Platte pipettiert. Pro Well wurden nun 100µl eines Gemischs aus 100µl Reagenz A und 2µl aus Reagenz

B zu den Proteinproben hinzugefügt. Die Messung erfolgte nach 45-minütiger Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C. Die Absorptionsmessung wurde bei einer Wellenlänge von 570nm durchgeführt, die Berechnung der Standardkurve und der Proteinkonzentrationen erfolgte automatisch durch die mitgelieferte Software.

5.2.3.4 Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) basiert auf dem Prinzip der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer molekularen Größe. Diese Elektrophorese wird mit denaturierten Proteinen durchgeführt, da die Laufgeschwindigkeit eines Proteins im Gradienten-Gel auch von Sekundär- und Tertiärstruktur sowie von Ladungen abhängig ist. Um nicht-kovalente Bindungen in den Proteinen aufzubrechen, werden die Proben in Laemmli-Puffer, welcher unter anderem das anionische Detergenz SDS enthält, gekocht. Durch das hinzugefügte Beta-Mercaptoethanol werden intramolekulare, kovalente Disulfidbrücken zu freien Thiolgruppen reduziert. Durch das Auflösen dieser Bindungen verlieren die Proteine ihre Sekundär- und Tertiärstruktur. Das SDS bindet mit einem Verhältnis von 1,4g SDS pro 1g Protein (1 SDS-Molekül pro 2 Aminosäuren) an die vorliegenden Peptidketten und sorgt für eine einheitlich negative Ladung.

Nach dem Anlegen einer Spannung an das Gradienten-Gel laufen die negativ geladenen Proteine nun in Richtung Anode, eine Auftrennung erfolgt durch die unterschiedliche Porengröße im Gel.

Sämtliche Gelelektrophoresen in dieser Arbeit wurden mit „Mini Protean TGX Stainfree Gels“ von Bio-Rad durchgeführt. Diese Gele enthalten Haloalkan (TriHalo-Komplex), welches nach Aktivierung durch UV-Strahlung kovalent an die Tryptophanreste der Proteine bindet. Nach Anregung durch UV-Strahlung emittiert dieser Komplex Licht, welches mit Hilfe eines Imagers detektiert werden kann. Dies ermöglicht eine Überprüfung auf korrekte Auftrennung der Proteine im Gel sowie auf einen vollständigen Transfer der Proteine auf die zugehörige Membran.

Nachdem zuvor eine Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte, wurden die Proben zuerst mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 40µg Protein pro 15µl Lösung verdünnt. Daraufhin wurde β-Mercaptoethanol 1:10 mit 4x Laemmli-Puffer verdünnt und jeweils 5µl dieses Ladepuffers zu den verdünnten Proteinproben gegeben, sodass das Gesamtvolumen jeder Probe 20µl betrug. Nach 5-minütigem Aufkochen der Proben bei 95°C erfolgte eine Zentrifugation für weitere 5 Minuten bei 13.000 RPM und 4°C. Im Anschluss wurden die so behandelten Proben in die einzelnen Taschen des Gels geladen. Diese Taschen wurden zuvor gründlich gespült, pro Tasche wurden 20µl des Proteinlysats eingebracht. Als Größenindikator wurden 3µl Marker (Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific) in der ganz rechten und in der ganz linken Tasche verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach Größe erfolgte in 1x TGS-Laufpuffer (TRIS, Glycin, SDS) für 16 Minuten unter einer angelegten Spannung von 300 Volt. Das Gel wurde anschließend in den Imager gegeben, für 90 Sekunden durch UV-

Strahlung aktiviert, dokumentiert (4 Sekunden, UV-Strahlung, Filter 2) und zum Abschluss auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert.

5.2.3.5 Immunoblot

Der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgt, um in den nächsten Schritten spezifische Proteine detektieren zu können. Dieser Transfer erfolgt erneut nach Anlegen einer Spannung, woraufhin die entfalteten und von negativen Ladungen umgebenen Proteine in Richtung der positiv geladenen Elektrode wandern. Aus diesem Grund wird die Nitrocellulose-Membran zwischen Gel und Anode platziert.

Diese Übertragung erfolgte im Semi-Dry-Verfahren. Das Gel wurde zwischen Membran und zwei in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren platziert und die Kassette daraufhin verschlossen. Der eigentliche Transfer erfolgte dann bei 25 Volt und 1,3 Ampere für 7 Minuten. Anschließend erfolgte im Imager eine Dokumentation der Membran (4 Sekunden, UV-Bestrahlung, Filter 2), um die erfolgreiche Übertragung der Proteine auf die Membran zu überprüfen. Die Membran wurde dann mit 1x TBST (engl.: TRIS-buffered saline with Tween20) insgesamt 4-mal für 10 Minuten auf der Schüttelplatte gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, schloss sich darauf ein 1,5 Stunden langer Block der Membran auf der Schüttelplatte in einer Lösung aus 1x TBST mit 0,1% Tween20 und 5% Magermilchpulver an. Durch Blockade dieser unspezifischen Epitope kann bei gleichzeitiger Verringerung des Hintergrundsignals die Signalspezifität erhöht werden.

Die jeweiligen Primärantikörper, die gegen ein Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet sind, wurden in 5ml 1x TBST mit 5% Magermilchpulver verdünnt und gemeinsam mit der Membran in der Regel für 48 Stunden bei 4°C in einem Zentrifugenröhrchen auf dem Rollenmischer inkubiert. Die genauen Inkubationszeiten unterschieden sich in einigen Fällen gemäß der Herstellerangaben für die einzelnen Antikörper.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Membranen aus der Antikörperlösung entnommen und insgesamt 4-mal für 10 Minuten in 1x TBST auf der Schüttelplatte gewaschen. Im Anschluss erfolgte für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur die Inkubation der Membran mit den korrespondierenden Sekundärantikörpern gemäß Ursprungsspezies (Kaninchen respektive Maus) auf der Schüttelplatte. Die Sekundärantikörper wurden in 15ml 1x TBST mit 5% Magermilchpulver gemäß der Herstellerangaben verdünnt. Um ungebundene Sekundärantikörper von der Membran zu entfernen, wurde sie abermals 4-mal für 10 Minuten auf der Schüttelplatte in 1x TBST gewaschen.

Um nun die spezifisch markierten Proteine detektieren zu können, wurde die Membran im Imager-System platziert und für eine Minute mit 2ml Detektionslösung inkubiert. Das hier verwendete Detektionslösung-Kit „SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ von ThermoFisher Scientific besteht aus zwei Reagenzen, zum einen aus Luminol und zum anderen aus stabiler Peroxidlösung (Meerrettichperoxidase), von denen jeweils 1ml vor der Zugabe auf die Membran in einem Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß miteinander vermischt wurden. Der Sekundärantikörper bindet daraufhin kovalent

an die Meerrettichperoxidase, welche Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu 3-Aminophthalat oxidiert. Dieses emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 425nm und kann mit Hilfe des Imager-Systems detektiert werden.

5.2.4 sPD-L1 ELISA und Gewinnung von PD-L1-mRNA aus Blutproben

5.2.4.1 Probengewinnung aus den Zellkulturüberständen

Vor der RNA- oder Proteinisolation die Asservierung von 1ml Nährlösungsüberstand, um diesen später für den sPD-L1 Sandwich-ELISA (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay) verwenden zu können. Hierzu wurden zunächst tote Zellen im Überstand für 10 Minuten bei 1.200 RPM und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt, für 20 Minuten bei 4.000 RPM und 4°C zentrifugiert, in ein neues Mikroreaktionsgefäß gegeben und bei -80°C eingefroren.

5.2.4.2 Probengewinnung aus Patientenblut

Zusätzlich wurden Blutproben von Patienten vor und nach Tumorresektion asserviert. Es erging unter dem Aktenzeichen 125/16 ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg zur Durchführung dieser Studie. Nach ausführlicher Aufklärung wurde eine schriftliche Einwilligungserklärung von allen Patienten eingeholt. Die Blutabnahmen erfolgten im Rahmen der zur Behandlung notwendigen routinemäßig durchgeführten Blutabnahmen. Der Zeitraum zwischen prä- und postoperativ gewonnenen Proben war mindestens 8 Tage, maximal 57 Tage und im Median 15 Tage. Insgesamt wurden 62 Patienten im Zeitraum von Dezember 2016 bis April 2019 eingeschlossen (Tab. 20).

Tabelle 20: Alters- und Geschlechterverteilung der eingeschlossenen Patienten (Mittelwert, Standardabweichung)

	Alle Patienten (n = 62)	Blutproben prä- vs. post- Tumorresektion (n = 17)
Alter (Jahre)	65,4 ± 11,6 (Min. 25, Max. 82)	68,2 ± 10,2 (Min. 46, Max. 82)
Geschlecht (♂/ ♀)	♂ = 37 (59,7%) ♀ = 25 (40,3%)	♂ = 11 (64,7 %) ♀ = 6 (35,3 %)

Neben den bei jeder Blutabnahme routinemäßig bestimmten Laborparametern wurde zusätzlich ein Blutserum-Röhrchen abgenommen, um hieraus mittels ELISA die Menge an sPD-L1 bestimmen zu können. Die unterschiedlichen Werte für n lassen sich dadurch erklären, dass nicht von allen Patienten komplette Probensätze asserviert wurden.

Um PD-L1-mRNA aus Vollblut zu bestimmen, wurde das „PAXgene-Blood-RNA“-Kit der Firma Pre-AnalytiX verwendet. Die Blutabnahme erfolgte direkt in die im Kit mitgelieferten „PAXgene Blood RNA“-Röhrchen, welche ein Blutvolumen von 2,5ml fassen. Die in den Röhrchen enthaltene Reagenz lysiert daraufhin die Blutzellen und stabilisiert intrazelluläre RNA. Die Blutproben wurden bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend bei -80°C gelagert oder direkt nach Abnahme weiterverarbeitet. Vor der Weiterverarbeitung der Proben erfolgte nach dem Auftauen eine mindestens zwei Stunden dauernde Inkubation der Probe bei Raumtemperatur, um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der Proben für 10 Minuten bei 4000 RPM bei Raumtemperatur. Nach Abpipettieren des Überstands wurden die Proben mit 4ml Aqua dest. resuspendiert, auf dem Vortexer mit der Pellet vermischt und erneut für 10 Minuten bei 4000 RPM und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen und das Pellet mit 350µl des mitgelieferten BM1-Puffers auf dem Vortexer resuspendiert und in 1,5ml-Mikroreaktionsgefäße überführt. Im nächsten Schritt wurden 300µl des BM2-Puffers und 40µl Proteinase K zugefügt, mit der Probe vermischt und für 10 Minuten bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine „PAXgene-Shredder-spin-column (violett)“, die in einem 2ml Röhrchen platziert war, gegeben und für 3 Minuten bei 13.000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues 1,5ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und mit 700µl 100-prozentigem Isopropanol auf dem Vortexer vermischt. 700µl hiervon wurden darauf in eine „PAXgene-Shredder-spin-column (rot)“ gegeben, die ebenfalls in einem 2ml Röhrchen platziert war, und für eine Minute bei 13.000 RPM und 4°C zentrifugiert. Die „PAXgene-Shredder-spin-column (rot)“ wurde dann in ein neues 2ml Röhrchen gegeben. Dieser Schritt wurde mit der verbliebenen Probe wiederholt.

Im nächsten Schritt wurden 350µl BM3-Puffer, welcher zuvor mit Ethanol verdünnt wurde, hinzugegeben und für 15 Sekunden bei 13.000 RPM bei 4°C zentrifugiert. Die „PAXgene-Shredder-spin-column (rot)“ wurde daraufhin in ein neues 2ml Röhrchen gegeben. Als nächstes wurden 10µl DNase-Lösung mit 70µl RDD-Puffer vermischt und gemeinsam auf die Membran der „PAXgene-Shredder-spin-column (rot)“ gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden erneut 350µl BM3-Puffer hinzugegeben, es erfolgte dann eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 13.000 RPM und 4°C. Erneut wurde die „PAXgene-Shredder-spin-column (rot)“ in ein neues 2ml Röhrchen überführt und der Durchfluss verworfen. Nach Zugabe von 500µl BM4-Puffer wurde der letzte Schritt 2-malig wiederholt, wobei beim letzten Schritt für 2 Minuten zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen, die „PAXgene-Shredder-spin-column (rot)“ in ein neues Röhrchen gegeben und dieses für 1 Minute bei 13.000 RPM und 4°C zentrifugiert. Die „PAXgene-Shredder-spin-column (rot)“ wurde dann, nachdem der Durchfluss verworfen wurde, in ein 1,5ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Hierzu

wurden 40µl BR5-Puffer gegeben und das Reaktionsgefäß für 1 Minute bei 13.000 RPM und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmalig wiederholt. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 65°C für 5 Minuten und daraufhin ein umgehendes Kühlen der Probe auf Eis. Die Probe wurde anschließend zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

5.2.4.3 Durchführung des ELISA

Zur Bestimmung von sPD-L1 aus Zellkulturüberständen und aus Blutserum wurde das „Human/Cynomolgus Monkey PD-L1/B7-H1 Quantikine ELISA-Kit“ von R&D-Systems verwendet. Die in diesem Kit enthaltene Mikroplatte wurde in den einzelnen Wells bereits mit einem für PD-L1 spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet. In jedes Well wurden 50µl mitgeliefertes RD1-41-Verdünnungsmittel gegeben. Anschließend wurden 100µl Standard, Kontrollprobe, Zellkulturüberstand oder Blutserum zu den entsprechenden Wells hinzugefügt. Nach der Abdeckung mit Folie folgte eine Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte. Dabei wird jegliches vorhandene PD-L1 in dieser Zeit durch den immobilisierten Antikörper gebunden. Daraufhin wurden ungebundene Substanzen mit jeweils 400µl mitgeliefertem Waschpuffer aus dem Well ausgewaschen, wobei dies insgesamt 4-malig wiederholt wurde. Nach der Entfernung sämtlicher Reste des Waschpuffers wurden jedem Well 200µl eines Konjugats hinzugefügt, welches enzymgebundene polyklonale Antikörper enthält, die spezifisch an PD-L1 binden. Die Mikroplatte wurde sodann wieder abgedeckt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf der Schüttelplatte inkubiert. Hieran schlossen sich vier weitere Waschschrte wie oben beschrieben an. Jeglicher verbliebener Waschpuffer wurde entfernt und in jedes Well 200µl Substratlösung pipettiert und für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei wird das enthaltene Substrat umgesetzt, was sich in einem Farbumschlag je nach Höhe der Menge an PD-L1 bemerkbar macht. Im Anschluss wurde in jedes Well 50µl Stopp-Lösung gegeben. Daraufhin erfolgte eine densitometrische Messung der unterschiedlichen Absorptionen im Mikroplattenleser. Die Absorptionsmessung wurde bei einer Wellenlänge von 570nm durchgeführt, die Berechnung der Standardkurve und der Proteinkonzentrationen erfolgte automatisch durch die mitgelieferte Software.

5.2.4.4 Auswertung der Ergebnisse

Die Analyse der Korrelation zwischen PD-L1-mRNA und sPD-L1 sowie zwischen dem Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) und sPD-L1 erfolgte mittels Pearson-Test. Der Vergleich der sPD-L1- und CRP-Werte vor und nach Tumorsektion erfolgte mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test. Die jeweilige Anzahl der Patienten ist in den entsprechenden Abbildungen vermerkt. Die Datenanalyse und die Erstellung der Graphen erfolgten mit Graphpad Prism Version 8.4.3.

6. Ergebnisse

6.1 Regulation von PD-L1 in RCC-Zelllinien

Es wurden zwei ccRCC-Zelllinien (CaKi-1 und A-498), eine unbestimmte RCC-Zelllinie (Cal-54) und eine pRCC-Zelllinie (CaKi-2) auf das Vorhandensein von PD-L1, PD-L2 und weiterer kritischer Mediatoren des IFN- γ -Signalwegs untersucht. Es konnte mRNA von PD-L1, PD-L2, IFN- γ R1, IFN- γ R2, IRF1, STAT1, JAK1 und JAK2 nachgewiesen werden, mit der Ausnahme von PD-L2-mRNA, welche sich nicht bei CaKi-2-Zellen nachweisen ließ. mRNA von PD-L1, PD-L2, JAK2, STAT1 und IRF1 wurden durch die Zugabe von IFN- γ bei den Zelllinien CaKi-1, A-498 und Cal-54 induziert, jedoch nicht bei CaKi-2 Zellen. Die Regulation von PD-L1 mRNA war kongruent zur Regulation von CXCL10-mRNA (engl.: C-X-C motif chemokine 10), eines typischen Chemokin-Zielgens von IFN- γ (Abb. 7).

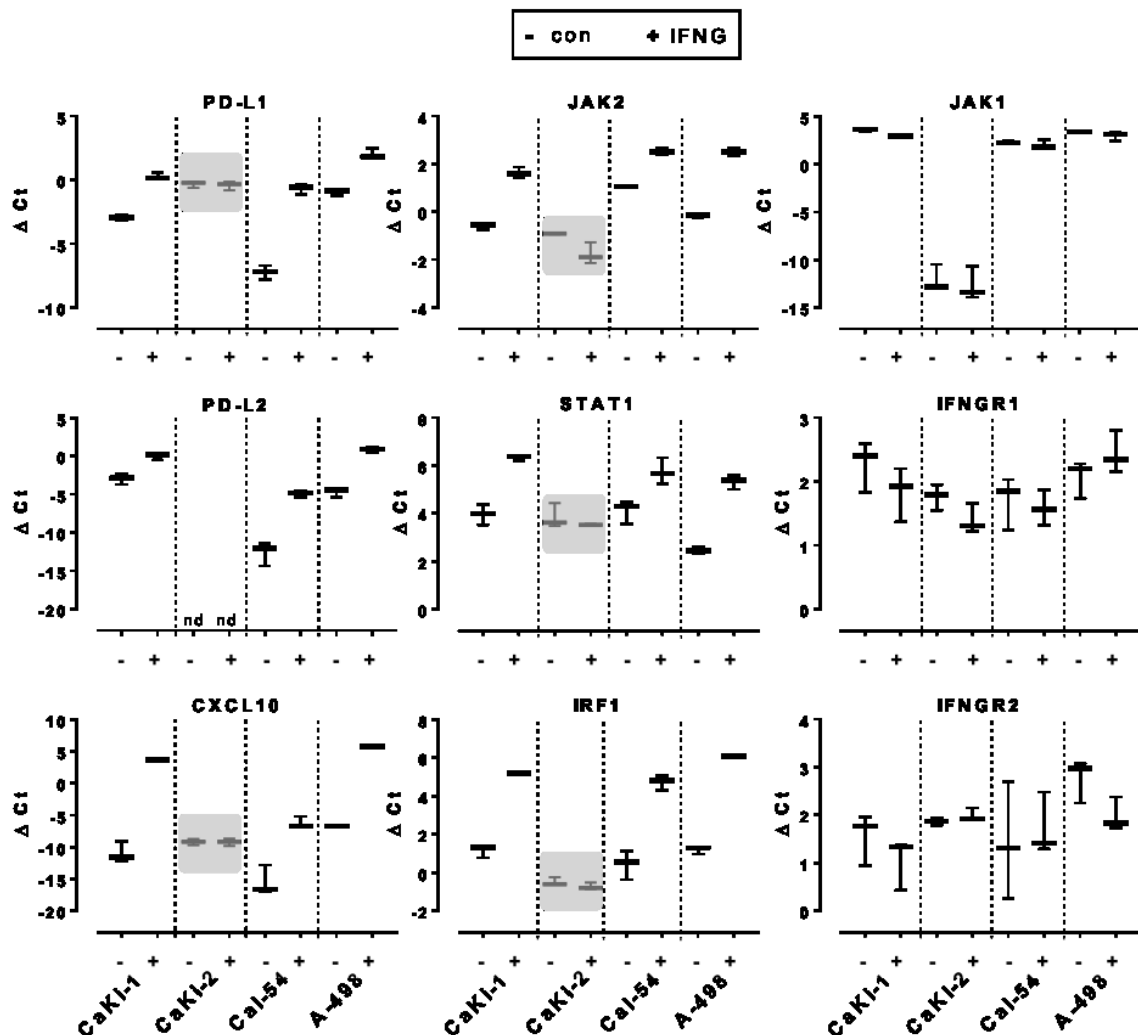


Abbildung 7: mRNA-Spiegel (Δ Ct) für PD-L1, PD-L2, CXCL10, JAK1, JAK2, STAT1, IRF1, IFN- γ R1, IFN- γ R2 in Kontrollzellen (- con) und mit IFN- γ (+IFNG, 10ng/ml für 24h) behandelten Zellen; Box-Plots zeigen Mittelwerte mit error-bars korrespondierend zu Minimal- und Maximalwerten (n=3); nd: unter Nachweisgrenze; Die Induktion von PD-L1-mRNA durch IFN- γ ist außer bei CaKi-2-Zellen (grau unterlegt) signifikant erhöht (Mann-Whitney-Test $p < 0,05$; Hänze et al., 2020)

Damit übereinstimmend zeigte sich auch auf Proteinebene eine ausgeprägte Induktion von PD-L1 in den Zelllinien CaKi-1, A-498 und Cal-54, nicht jedoch bei CaKi-2-Zellen. PD-L2 wurde durch IFN- γ

in den Zelllinien CaKi-1 und A-498, aber nicht in CaKi-2 und Cal-54 induziert. Eine durch IFN- γ ausgelöste Phosphorylierung von JAK2 (Phospho-JAK2) und JAK1 (Phospho-JAK1) als eine off-on-Antwort zeigte sich bei CaKi-1, A-498 und bei Cal-54-Zellen. Bei CaKi-2-Zellen war weder P-JAK1 noch P-JAK2 nachzuweisen. Die nicht-phosphorylierte Form von JAK1 blieb bei CaKi-1 und Cal-54 Zellen unverändert, war bei CaKi-2 Zellen nicht nachzuweisen und wurde bei A-498-Zellen durch IFN- γ induziert. Die nicht-phosphorylierte Form von JAK2 schien in den Zellen, die auf IFN- γ ansprachen, nur geringfügig induziert. Der Transkriptionsfaktor IRF1 war durch IFN- γ nur in den Zelllinien CaKi-1, Cal-54 und A-498 induzierbar, nicht bei CaKi-2-Zellen (Abb. 8).

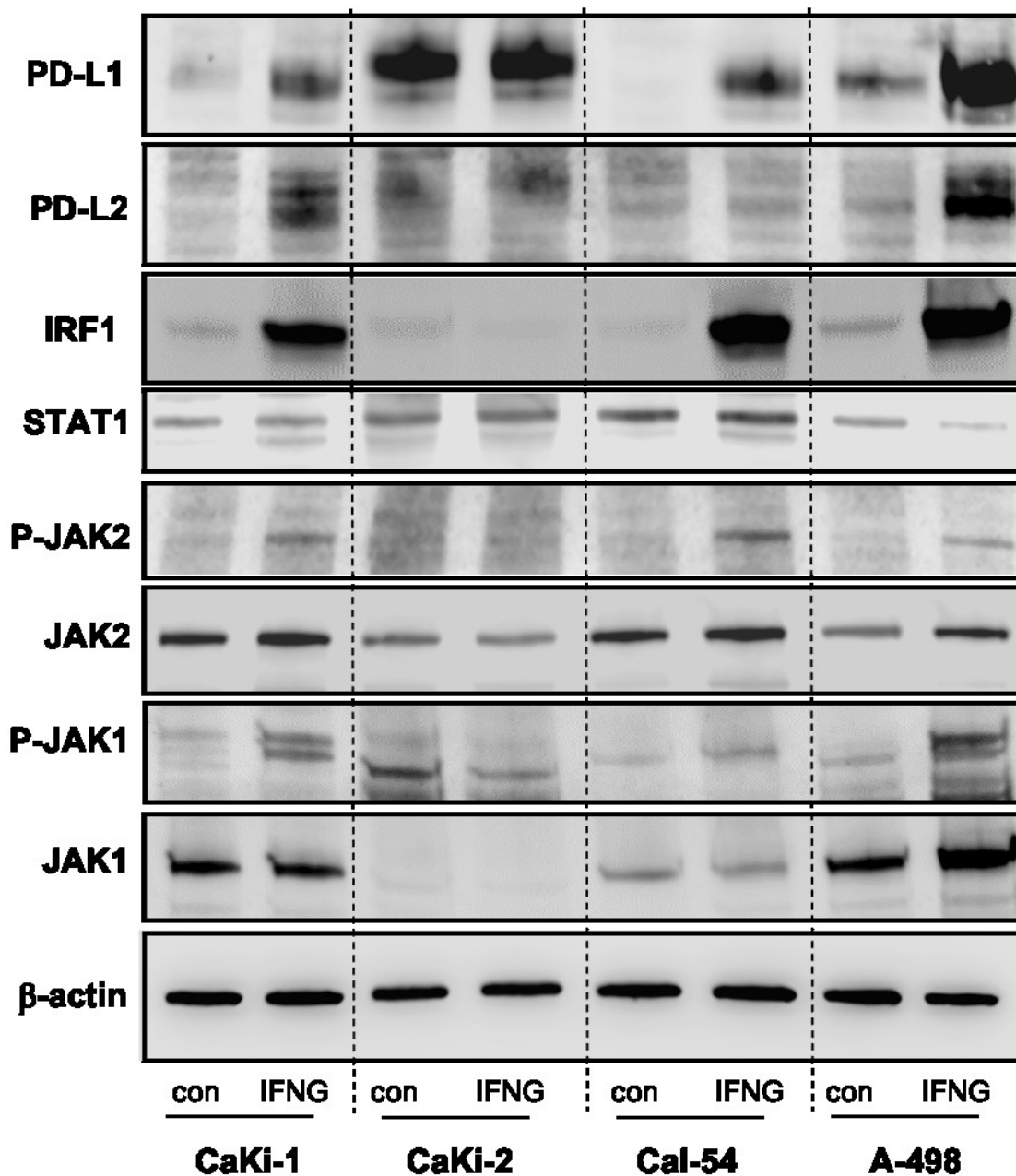


Abbildung 8: Western-Blot Analyse von Kontrollzellen (con) und mit IFN- γ (+IFNG, 10ng/ml für 24h) behandelten Zellen mit Antikörpern für PD-L1, PD-L2, p-JAK2, JAK2, p-JAK1, JAK1, IRF1 und zytoplasmatisches β -Actin. Molekulargewichte: PD-L1 ~50kd; PD-L2 ~50kd; Phospho-(P)-JAK2 ~125kd; JAK2 ~125kd; Phospho-(P)-JAK1 ~130kd; JAK1 ~130kd; IRF1 ~48kd; STAT1 ~90kd; β -Actin ~43kd (Hänze et al., 2020)

6.2 Etablierung des *knock-downs* von PD-L1 durch siRNA bei CaKi-1-Zellen: Effekte auf PD-L1 und sPD-L1

Nach Induktion von PD-L1 durch die Zugabe von IFN- γ wurde diese Induktion durch Transfektion von siRNA komplementär zu PD-L1 gehemmt, sodass ein geringerer Anteil an PD-L1-mRNA zu PD-L1 übersetzt wurde.

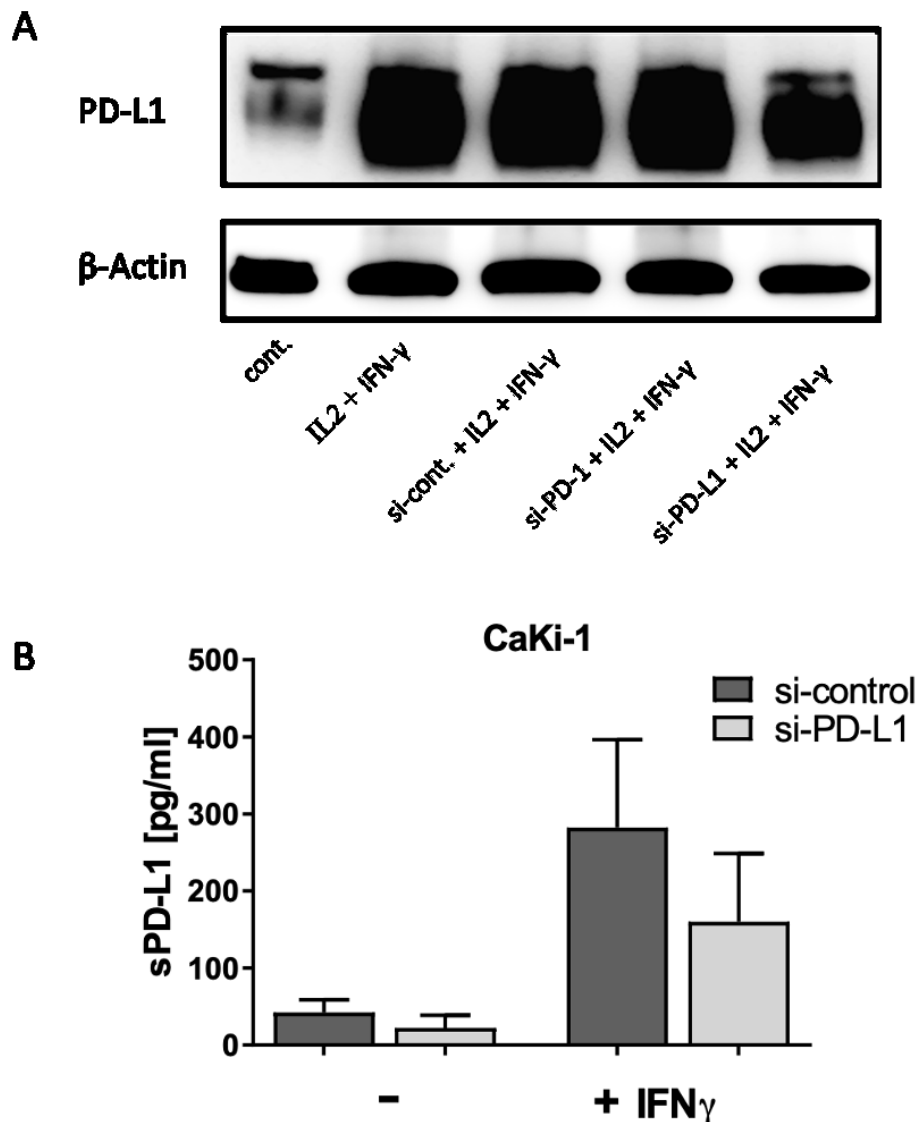


Abbildung 9: Effekt der Transfektion von PD-L1-siRNA bei CaKi-1-Zellen vor und nach Induktion von PD-L1 durch Zugabe von IFN- γ und IL-2 **A**) auf Proteinebene im Western Blot. Molekulargewichte: PD-L1 ~50kd; β -Actin ~43kd **B**) auf sPD-L1 (pg/ml) aus Zellkulturüberständen; 2-Faktoren Varianzanalyse (siPD-L1: $f=34,86$, $p<0,0001$; IFN- γ : $f=4,97$, $p=0,0154$; Interaktion: $f=2,54$, $p=0,0769$)

Dieser auf Proteinebene beobachtete inhibierende Effekt auf PD-L1 durch die Transfektion von siRNA war analog dazu im ELISA aus Zellkulturüberständen nachzuvollziehen. So war die Menge an sPD-L1 nach Transfektion etwa um ein Drittel geringer als die Menge an sPD-L1 in den Kontrollproben, welche ebenfalls mit IFN- γ behandelt wurden (Abb. 9).

6.3 Konstitutive und induzierbare Expression von PD-L1 bei CaKi-1- und CaKi-2-Zellen

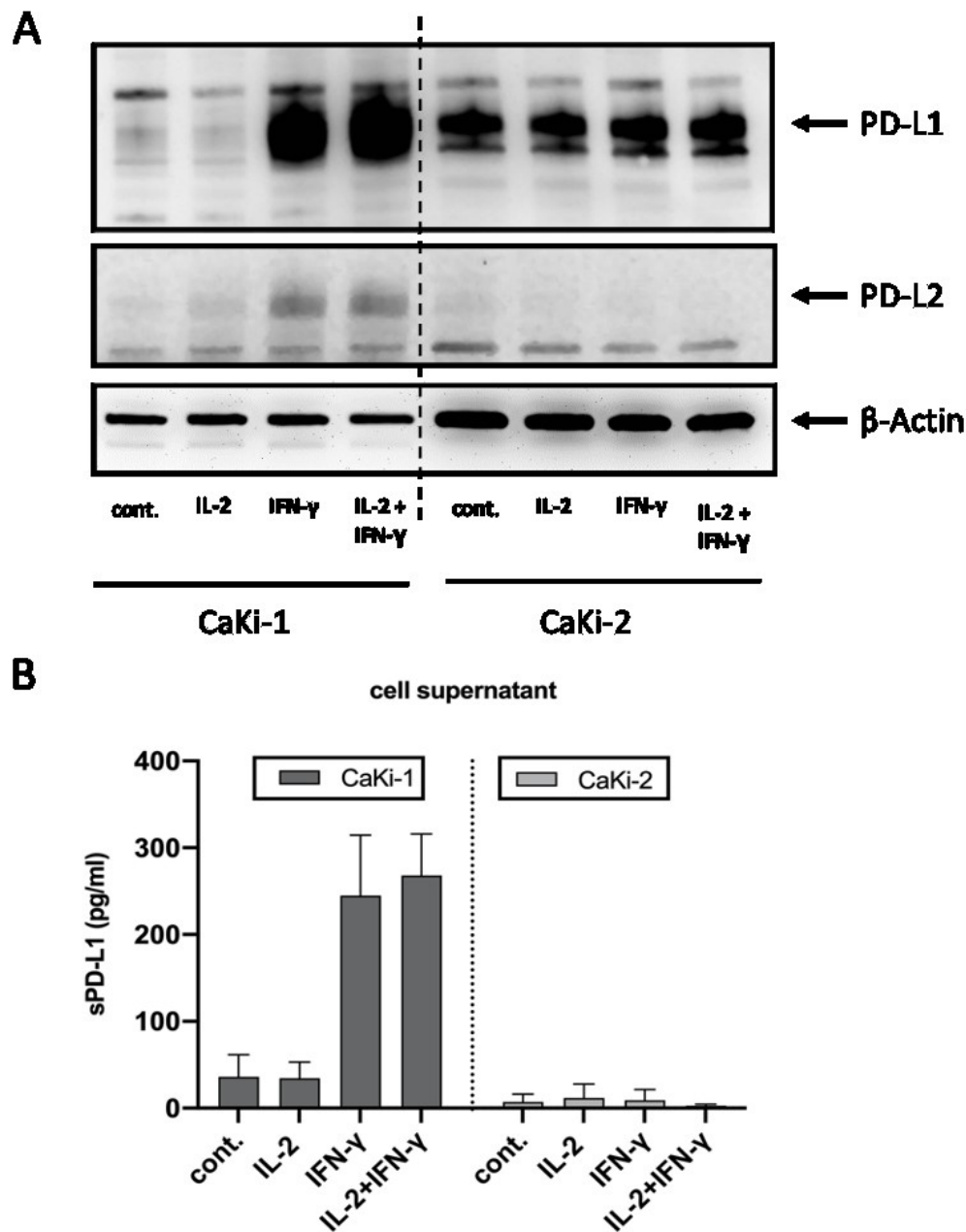


Abbildung 10: Vergleich zwischen CaKi-1- und CaKi-2-Zellen hinsichtlich ihrer IL-2- und IFN- γ -abhängigen Induktion von PD-L1 und PD-L2. **A)** Proteinnachweis im Western Blot; Molekulargewichte: PD-L1 ~50kd; PD-L2 ~50kd; β -Actin ~43kd; **B)** Nachweis von sPD-L1 (pg/ml) aus Zellkulturüberständen. Die Induktion von sPD-L1 durch IFN- γ bei CaKi-1-Zellen ist signifikant (Mann-Whitney-Test $p < 0,05$).

Die verschiedenen Expressionsmuster der zu untersuchenden Immuncheckpoint-Komponenten wurden an den RCC Zelllinien CaKi-1 und CaKi-2 im Western Blot mit und ohne die Zugabe der Zytokine IFN- γ und IL-2 untersucht (Abb. 10 A). Während eine IFN- γ -abhängige Induktion von PD-L1 bereits beschrieben wurde, sollte hierbei eine mögliche Induktion durch IL-2 überprüft werden. Weiterhin erfolgte die Bestimmung von sPD-L1 mittels ELISA aus Zellkulturüberständen (Abb. 10 B). Die Inkubation erfolgte jeweils für 24 Stunden.

Sowohl CaKi-1 als auch CaKi-2-Zellen exprimieren konstitutiv PD-L1, CaKi-1-Zellen zudem PD-L2. Durch Zugabe von IFN- γ lässt sich bei CaKi-1-Zellen, im Gegensatz zu CaKi-2 Zellen, die Expression von PD-L1 und PD-L2 stark induzieren. Die mittels ELISA detektierten Mengen an sPD-L1 in Zellkulturüberständen zeigten kongruente Ergebnisse, wobei CaKi-2-Zellen kaum sPD-L1 sezernierten.

6.4 Nachweis von sPD-L1 im Blut von RCC-Patienten prä-post Tumorresektion

Um die Auswirkungen einer Tumorresektion auf sPD-L1-Spiegel sowie mögliche Korrelationen zwischen PD-L1-mRNA- und sPD-L1-Spiegeln im Blut und dem Erkrankungsstadium bzw. dem Krankheitsausmaß identifizieren zu können, wurden bei Patienten sowohl vor als auch nach Tumornephrektomie Blutproben gewonnen und neben Standardlaborparametern mittels ELISA aus dem Blutserum auf sPD-L1 hin untersucht (Tab. 21). Die unterschiedliche Anzahl an Patienten erklärt sich dadurch, dass nicht von allen Patienten vollständige Probensätze gesammelt werden konnten. Nach Nephrektomie zeigte sich der sPD-L1-Spiegel im Serum im Vergleich zu den präoperativ gewonnenen Blutproben der jeweils gleichen Patienten deutlich erhöht. Der Entzündungsmarker CRP zeigte sich in den postoperativen Blutproben im Vergleich zu den präoperativen ebenfalls signifikant erhöht (Tab. 21; Abb. 11).

Tabelle 21: sPD-L1 und CRP prä- vs. post-Tumorresektion (Mittelwert, Standardabweichung, p, Wilcoxon-Test)

	Präoperativ	Postoperativ	p
sPD-L1 (pg/ml) n = 17	76,0 \pm 32,1 (Min. 40,1; Max. 157,7)	107,2 \pm 32,1 (Min. 51,6; Max. 186,3)	<0,0001
CRP (ng/ml) n = 17	18,1 \pm 24,6 (Min. 0,4; Max. 86,6)	59,6 \pm 42,5 (Min. 4,5; Max. 151,1)	0,0046

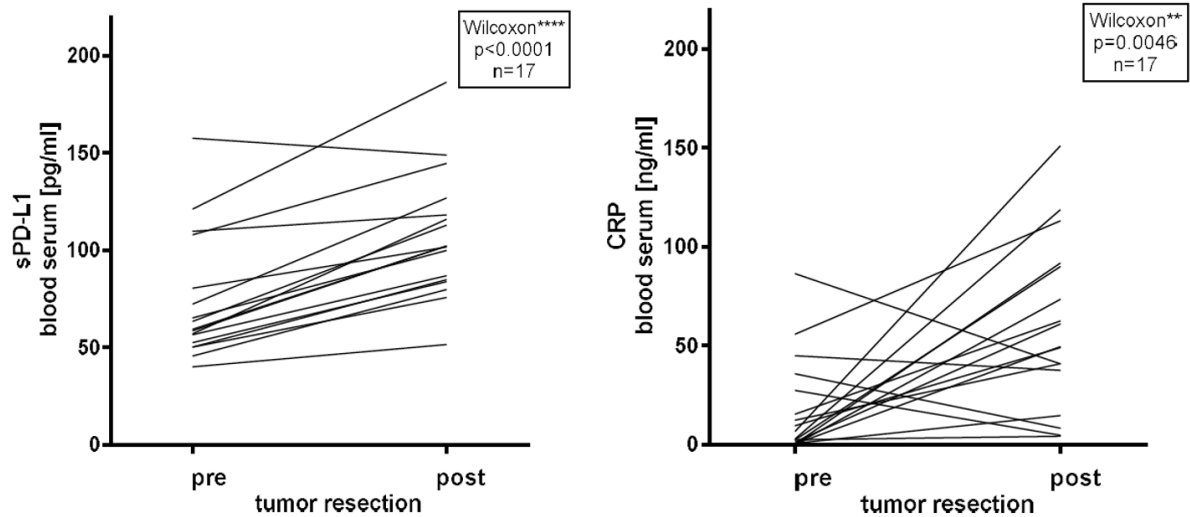


Abbildung 11: Nachweis von sPD-L1 und CRP prä- und post-Tumorresektion

Die sPD-L1-Spiegel im Serum korrelierten signifikant mit den CRP-Werten ($R = 0,53$; $p = <0,0001$; $n=62$). Zusätzlich zeigte sich eine mäßige Korrelation zwischen den sPD-L1-Spiegeln und den mit aus Vollblut bestimmten Spiegeln von PD-L1-mRNA ($R = 0,27$; $p = 0,0312$; $n = 62$). Zur Ermittlung dieser Korrelation wurden die präoperativ gewonnenen Blutproben verwendet (Abb. 12).

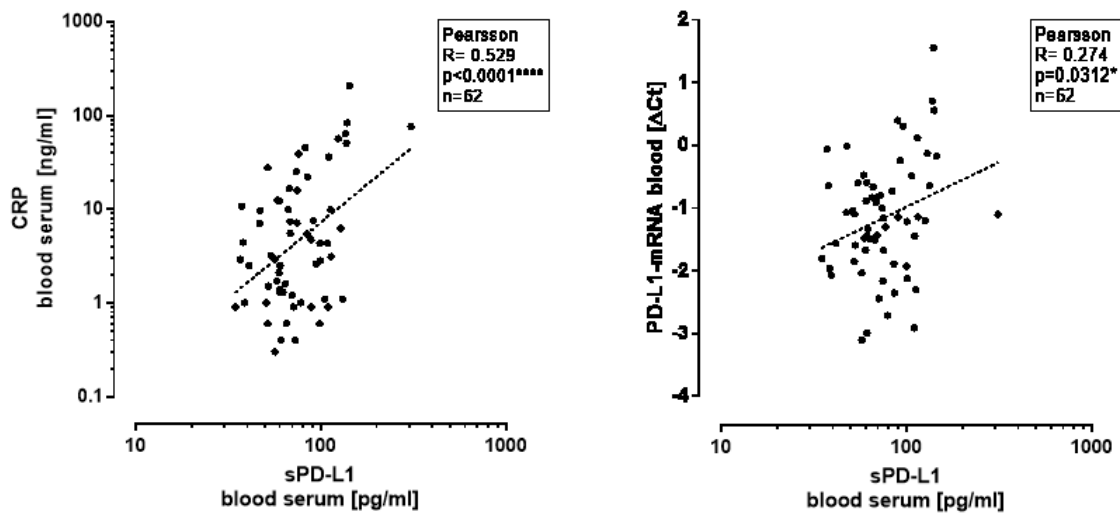


Abbildung 12: Korrelation zwischen sPD-L1 und CRP sowie zwischen sPD-L1 und PD-L1-mRNA

6.5 Interleukin-6 bei CaKi-1- und HepG₂-Zellen

Da der Entzündungsmarker CRP maßgeblich von Hepatozyten nach Stimulation mit Interleukin-6 (IL-6) synthetisiert wird und eine Korrelation zwischen CRP und PD-L1 nach Tumorresektion gezeigt werden konnte, wurde eine mögliche Induktion von PD-L1 durch IL-6 im Zellversuch an CaKi-1-Zellen und an der HCC-Zelllinie HepG₂ überprüft. Neben der Kontrollprobe ohne Zugabe von Zytokinen wurde zudem eine IFN- γ -Kontrolle durchgeführt, da eine Induktion von PD-L1 durch IFN- γ bei CaKi-1-Zellen zuvor bereits gezeigt werden konnte. Die Menge an PD-L1-mRNA wurde mittels PCR bestimmt, die Menge an PD-L1-Protein wurde im Western Blot detektiert. Aus den gewonnen Nährlösungsüberständen wurde die Menge an sPD-L1 mittels ELISA bestimmt.

Für keine der beiden untersuchten Zelllinien konnte auf mRNA- oder auf Proteinebene ein Effekt auf PD-L1 durch die Zugabe von IL-6 nachgewiesen werden. CaKi-1-Zellen exprimieren sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene größere basale Mengen an PD-L1 als HepG₂-Zellen. Die im Zellüberstand bestimmten Mengen an sPD-L1 waren ebenfalls in den Kontrollzellen und den mit IL-6 behandelten Zellen bei CaKi-1-Zellen größer als bei HepG₂-Zellen. Bei den Kontrollzellen waren geringfügig höhere Spiegel an sPD-L1 aus den Zellkulturüberständen nachzuweisen als bei den mit IL-6 stimulierten Zellen. Die in den vorigen Kapiteln bereits beschriebene Induktion von PD-L1 durch Zugabe von IFN- γ bei CaKi-1 Zellen konnte hier erneut reproduziert werden. Sie zeigte sich ebenfalls bei den untersuchten HepG₂-Zellen, sowohl in Bezug auf mRNA und Proteinspiegel als auch für sPD-L1 aus Zellkulturüberständen, wobei der Effekt etwas schwächer ausgeprägt war als bei CaKi-1-Zellen (Abb. 13).

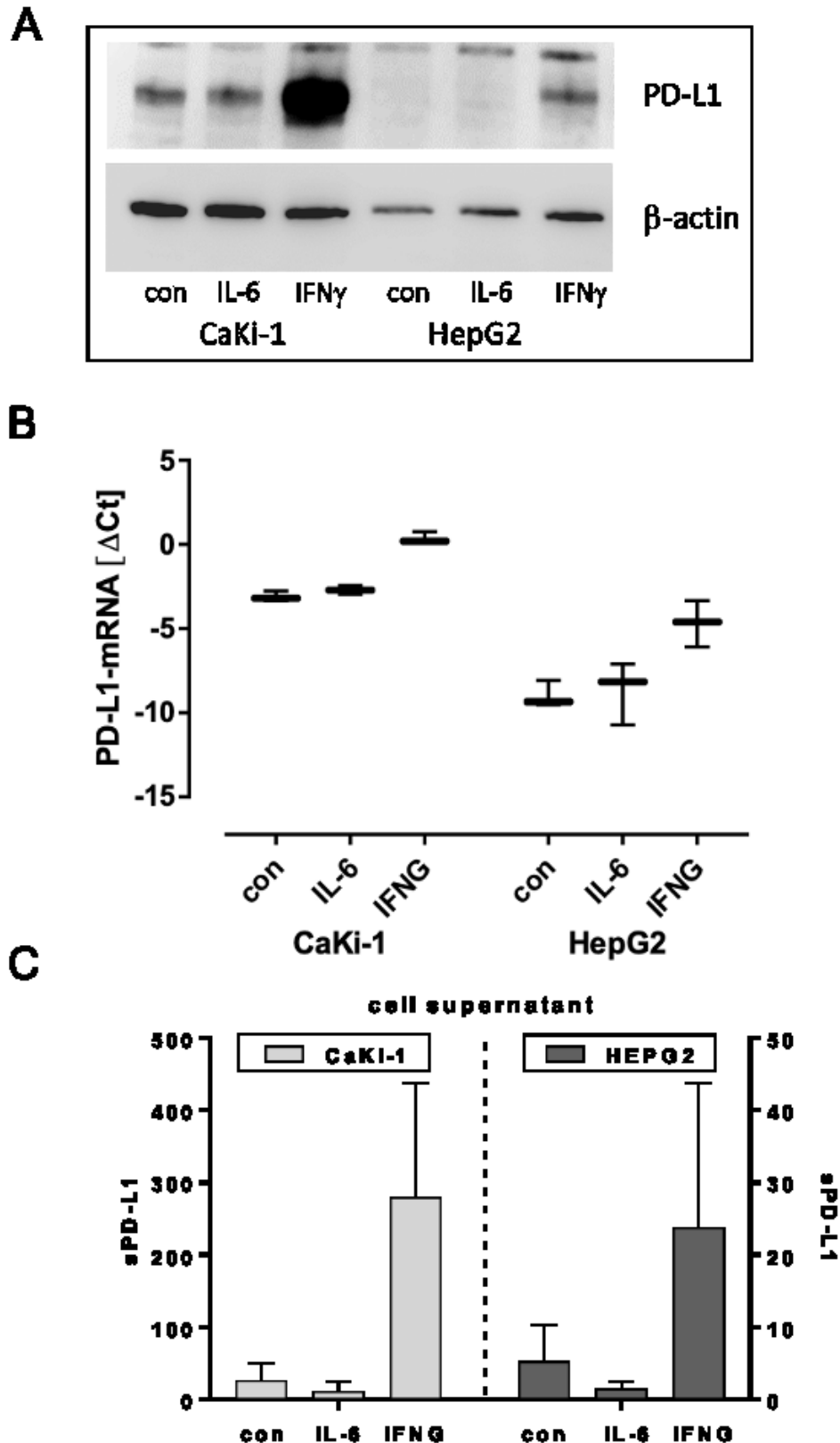


Abbildung 13: PD-L1 bei CaKi-1- und bei HepG2-Zellen nach Zugabe von IL-6 und IFN- γ . **A)** Proteinnachweis im Western Blot; Molekulargewichte: PD-L1 ~50kd; β -Actin ~43kd. **B)** PD-L1-mRNA in der rt-PCR. Die Induktion von PD-L1-mRNA durch IFN- γ ist signifikant (Mann-Whitney-Test $p < 0,05$); Box-Plots zeigen Mittelwerte mit error-bars korrespondierend zu Minimal- und Maximalwerten ($n=3$). **C)** Nachweis von sPD-L1 (pg/ml) aus Zellkulturüberständen. Die Induktion von sPD-L1 durch IFN- γ ist signifikant (Mann-Whitney-Test $p < 0,05$)

7. Diskussion

Für Patienten, welche an einer metastasierten Tumorerkrankung leiden, waren und sind die zur Verfügung stehenden Therapien stark limitiert und damit einhergehend die Lebensqualität und die Lebenserwartung zumeist deutlich herabgesetzt. Während sich die Therapieoptionen häufig auf unspezifische und nebenwirkungsreiche Chemo- und Immuntherapeutika oder Strahlentherapien beschränkten, welche das Leben der Patienten oft nur geringfügig verlängern konnten und einen nachteiligen Einfluss auf die Lebensqualität hatten, gelang es mit der Einführung der Immuncheckpoint-Inhibitoren, eine für eine relevante Anzahl an Patienten verträglichere und wirksamere Therapiemöglichkeit zu etablieren. Die Verleihung des Nobelpreises für Physiologie oder Medizin an J.P. Allison und T. Honjo im Jahr 2018 für die Entdeckung und Erforschung der Immuncheckpoint-Inhibitoren scheint vor dem Hintergrund dieses Paradigmenwechsels in der Onkologie mehr als folgerichtig (Braun et al., 2020). Nach der ersten Zulassung eines Immuncheckpoint-Inhibitors zur Therapie des metastasierten malignen Melanoms 2011 (Ipilimumab) folgte 2014 die Zulassung von Pembrolizumab und Nivolumab, welche 2015 zudem zur Therapie des kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC, engl.: non small cell lung carcinoma) zugelassen wurde. Ebenfalls im Jahr 2015 erfolgte die Zulassung von Nivolumab zur Therapie des chemo- und strahlenresistenten RCC. In den nächsten Jahren folgten Zulassungen von Immuncheckpoint-Inhibitoren für zahlreiche weitere Tumorentitäten, im Jahr 2019 wurden schließlich Pembrolizumab und Avelumab zur Therapie des RCC zugelassen (Schardt, 2020). Trotz der klaren Evidenzlage zugunsten der Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren zeigt sich ein heterogenes Ansprechen der einzelnen Patienten, weswegen in dieser Arbeit die Regulation des PD-1/PD-L1-Systems bei RCCs auf unterschiedlichen Ebenen untersucht wurde, um Gründe hierfür identifizieren zu können. Die Beobachtungen lassen sich im Wesentlichen in folgenden Punkten zusammenfassen:

Es konnte gezeigt werden, dass sich RCC-Subtypen in Hinblick auf das IFN- γ abhängige *Signaling* und die daraus resultierende Induktion von PD-L1 unterscheiden. Bei Zellversuchen mit ccRCC-Zelllinien konnte PD-L1 durch Zugabe von IFN- γ induziert werden, wohingegen dies bei der untersuchten pRCC-Zelllinie nicht möglich war. Diese Induktion zeigte sich auch für die in die Zellkulturüberstände abgegebene lösliche Form von PD-L1, sPD-L1.

Ebenfalls in der Zellkultur konnte ein *knock-down* von PD-L1 durch Transfektion von siRNA bei einer ccRCC-Zelllinie erreicht werden, was insbesondere auch in einer deutlichen Inhibition der löslichen Form von PD-L1 resultierte. Dies lässt auf eine direkte Verbindung zwischen zellulärem PD-L1 und sPD-L1 schließen.

Durch die Bestimmung von sPD-L1 aus dem Blutserum von Patienten mit RCC vor und nach Tumorektomie konnte eine Korrelation zwischen sPD-L1 und dem Entzündungsmarker CRP nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich eine moderate Korrelation zwischen sPD-L1 im Serum und PD-L1-mRNA

bestimmt aus Vollblut. Da die Werte für sPD-L1 postoperativ anstiegen, scheint die Rationale für sPD-L1 als Tumormarker im Blutserum nicht direkt gegeben; sPD-L1 im Blut ist offenbar auf verschiedenen Ebenen mit nicht klarem Ursprung reguliert.

Da der Entzündungsmarker CRP maßgeblich von Hepatozyten nach Stimulation mit IL-6 synthetisiert wird und wie oben beschrieben eine Korrelation zwischen CRP und sPD-L1 aus Patientenblutproben gezeigt werden konnte, wurde im Zellversuch überprüft, ob IL-6 die Bildung von PD-L1 induzieren kann. Dies ließ sich weder für die untersuchte ccRCC-Zelllinie CaKi-1 noch für die HCC-Zelllinie HepG₂ bestätigen.

7.1 IFN- γ -abhängige Induktion von PD-L1 bei RCC-Zelllinien

Die Interaktion zwischen PD-L1 und seinem korrespondierendem Rezeptor PD-1 führt zu einer drastischen Inhibition der T-Zell-Funktion bis hin zur Apoptose der T-Zellen. Durch die gesteigerte Expression von PD-L1 sind Tumorzellen somit dazu in der Lage, der Immunantwort zu entgehen. Diese Immunevasion erschwert die Therapie und geht mit einer schlechten Prognose einher (Wherry & Kurachi, 2015). Aus diesem Grund könnte die Expression von PD-L1 als Biomarker dienen, um den Effekt einer Immuncheckpoint-Inhibition vorherzusagen und zu bewerten. Trotz dessen wird die Auswirkung der Expression von PD-L1 auf die Prognose von Patienten mit RCC bis zum heutigen Tag kontrovers diskutiert. Einige Studien beschreiben einen Zusammenhang zwischen hohen Expressionsspiegeln von PD-L1 und größeren Tumoren, schlechteren histologischen Gradings, fortgeschrittenen TNM-Stadien und entsprechend einem erhöhtem Risiko, daran zu versterben (Iacovelli et al., 2016; Xu et al., 2015). Im Gegensatz dazu berichten andere Studien von einer Assoziation niedriger PD-L1-mRNA-Spiegel mit höheren Tumorstadien, schlechteren histologischen Gradings und höheren Metastasierungsraten (Ning et al., 2016).

Ähnliches konnte bereits für diverse andere Tumorentitäten beobachtet werden. So waren beim Harnblasenkarzinom bei Patienten, welche weder anti-PD-L1-Antikörper noch anti-PD-1-Antikörper erhielten, erhöhte PD-L1-mRNA-Spiegel mit verlängertem Überleben assoziiert (Breyer et al., 2018). Beim Mammakarzinom waren hohe PD-L1-mRNA-Spiegel mit gesteigerten Ansprechraten auf Chemotherapien assoziiert und wurden als Biomarker für eine antitumorale Immunantwort vorgeschlagen (Denkert et al., 2015; Bertucci et al., 2015). Patienten, welche an einem malignen Melanom litten und nicht auf eine Therapie mit CTLA-4-Inhibitoren ansprachen, zeigten ein gestörtes IFN- γ -*Signaling* (Gao et al., 2016). Analog hierzu waren loss-of-function-Mutationen in den für JAK1 und JAK2 kodierenden Genen, welche ein normales IFN- γ -*Signaling* verhinderten, sowohl mit primärer (Shin et al., 2017) als auch mit erworbener (Zaretsky et al., 2016) Resistenz gegenüber einer PD-1-/PD-L1-basierten Immuncheckpoint-Inhibitor Therapie assoziiert. Umgekehrt führte eine gleichzeitige Amplifikation von PD-L1/PD-

L2 und JAK2, welche ein verstärktes IFN- γ -*Signaling* bewirkte, zu einem gesteigerten Ansprechen gegenüber Immuncheckpoint-Blockade bei Patienten mit Hodgkin-Lymphom (Ansell et al., 2015; Sharma et al., 2017).

Ebenso wie PD-L1-mRNA-Spiegel wurde durch immunhistochemische Detektionsverfahren die PD-L1 Proteinexpression als prognostischer Marker bei diversen Malignitäten untersucht (Teng et al., 2015). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterschieden sich jedoch insoweit von den oben beschriebenen Erkenntnissen in Bezug auf die PD-L1-mRNA-Spiegel, als dass eine größere Menge an nachgewiesenem PD-L1 Protein mit verkürztem Überleben bei verschiedenen Tumorentitäten, unter anderem beim RCC, unabhängig von der angewandten Therapie, assoziiert war (McDermott, Huseni et al., 2018). Auch beim malignen Melanom war ein hoher PD-L1 Protein-Score mit einem verkürzten Überleben assoziiert (Benci et al., 2016). Große Mengen an PD-L1 Protein in Tumorzellen oder Makrophagen konnten mit einem schlechteren Outcome in Verbindung gebracht werden und das *knock-out* von PD-L1 oder des IFN- γ -*Signalings* über STAT1 im Mausmodell verlängerten das Überleben (Benci et al., 2016).

Diese vermeintlich gegensätzlichen Erkenntnisse lassen sich dadurch erklären, dass PD-L1 Proteinspiegel und PD-L1-mRNA-Spiegel nicht miteinander übereinstimmen. Grund hierfür ist, dass zahlreiche posttranskriptionelle Regulationsmechanismen für PD-L1 existieren. Hierzu zählen unter anderen Signalproteine wie PBRM1, CMTM4, CMTM6 (engl.: Chemokine-Like factor super family-like MARVEL transmembrane domain), Ras, MEK und ERK, welche PD-L1 im Anschluss an die Transkription verändern (Burr et al., 2017; Glodde & Hölzel, 2017; Coelho et al., 2017). Weiterhin könnten mikroRNAs wie mir-155 und mir-513 zur Regulation beitragen (Gong, A.-Y. et al., 2009; Yee et al., 2017). Auf Grund dieser posttranskriptionellen Veränderungen könnte der PD-L1-mRNA-Spiegel die tatsächliche Induktion von PD-L1 als Konsequenz der Antigenerkennung durch die T-Zelle besser abbilden als der PD-L1 Proteinspiegel. Nichtsdestotrotz erlaubt die Bestimmung von mRNA-Spiegeln aus Tumorgewebe-Homogenisaten keine Unterscheidung der Expression von Tumorzellen, Immunzellen oder anderen Zellen des umgebenden Gewebes.

In der von Ning et al. 2016 durchgeführten GSEA (engl.: gene set enrichment analysis) zeigte sich PD-L1 als unabhängiger prognostischer Faktor für an einem ccRCC erkrankte Patienten, nicht jedoch für Patienten, die an einem pRCC litten. Bei ccRCC-Zellen konnte zudem eine Korrelation zwischen Mutationen im VHL-Gen und Expression von PD-L1 gezeigt werden, wiederum jedoch nicht bei pRCC-Zellen (Messai et al., 2016).

In dieser Arbeit konnte die Heterogenität der unterschiedlichen histologischen Subtypen in Zellversuchen in Bezug auf das IFN- γ abhängige *Signaling* und die daraus resultierende Induktion von PD-L1 nachgewiesen werden. Bei den ccRCC-Zelllinien CaKi-1 und A-498 sowie bei der unbestimmten Zelllinie Cal-54 war die Expression von PD-L1 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene durch Zugabe von IFN- γ massiv induzierbar, wohingegen bei der pRCC-Zelllinie CaKi-2 kein solcher Effekt zu beobachten war. Die Zugabe von IL-2 hatte keinen Effekt auf die Expression von PD-L1. Dies suggeriert,

dass PD-L1 bei den verschiedenen histologischen Subtypen unterschiedliche Rollen einnimmt und impliziert, dass eine Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren nicht für alle RCC-Patienten gleichermaßen zur Anwendung kommen sollte. Die Beobachtung, dass PD-L1 in CaKi-2 Zellen durch IFN- γ nicht induzierbar ist, entspricht einer anderen Arbeit, in der beschrieben wurde, dass bei CaKi-2 Zellen die IFN- γ -Signalkaskade auf einer früheren Ebene *upstream* von JAK nicht intakt ist (Dovhey et al, 2000). Das unterschiedliche Ansprechen auf IFN- γ könnte die Grundlage für die von unserer eigenen Arbeitsgruppe (Hänze et al., 2020) und von Ning et al. 2016 beschriebenen Unterschiede in Hinblick auf das Überleben von RCC-Patienten in Abhängigkeit von PD-L1-mRNA-Spiegeln darstellen. So könnte die vermehrte Expression von PD-L1 in IFN- γ abhängigen Tumorzellen als Reaktion auf eine gesteigerte T-Zell-Antwort, welche im Rahmen der Antigenpräsentation und der MHC-Erkennung mit einer Ausschüttung von IFN- γ einhergeht, angesehen werden. Im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus könnte so bei aktiver T-Zelle in diesen Tumorzellen die Freisetzung von IFN- γ zu einer reaktiv gesteigerten Expression von PD-L1-mRNA führen. Eine intakte Immunantwort würde demnach für eine geminderte Aggressivität des Tumors sprechen, was die zunächst paradox erscheinende Korrelation zwischen erhöhten PD-L1-Expressionsspiegeln und verlängertem Überleben erklären könnte (Taubke et al., 2012). Aus diesem Grund könnte der Spiegel an PD-L1-mRNA im Tumorgewebe ein günstiger prognostischer Faktor für diejenigen Tumoren sein, welche IFN- γ abhängig PD-L1 exprimieren.

7.2 Nachweis von sPD-L1 aus Zellkulturüberständen

Der Ursprung und die Funktion der löslichen Form von PD-L1 im Blut sind bislang nicht abschließend geklärt. Nachdem zuvor bereits lösliche Formen diverser Mitglieder der B7-Familie nachgewiesen werden konnten (Oaks & Hallett, 2000; Simon et al., 2006), konnte im Jahr 2011 ein Sandwich-ELISA zur Detektion und Quantifizierung der löslichen Form von PD-L1, sPD-L1, entwickelt werden, der es ermöglicht, sPD-L1 aus Blutserum und aus Zellkulturüberständen nachzuweisen. Die Entwickler dieses ELISAs konnten bereits zu diesem Zeitpunkt zeigen, dass die Produktion von sPD-L1 bei den untersuchten Zelllinien durch einen zelleigenen Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor (MMPI) unterdrückt werden konnte und das sezernierte sPD-L1 seine Bindungsfähigkeit an den zugehörigen Rezeptor PD-1 beibehielt (Chen, Y. et al., 2011).

Für PD-L1 gelang zuletzt der Nachweis zahlreicher alternativer PD-L1-mRNA Splicing-Varianten (Gong, B. et al., 2019; Mahoney et al., 2019). Weiterhin konnten PD-L1-Isoformen, die durch endogene Retroelement-Exaptation entstanden, beschrieben werden (Ng et al., 2019). Diese Varianten von PD-L1-mRNA werden in lösliche Formen von PD-L1 übersetzt. Zusätzlich zu diesen Möglichkeiten zur Entstehung von sPD-L1 wurde eine Abspaltung von sPD-L1 von membranständigem PD-L1 durch die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 (engl.: a disintegrin and metalloproteinase) beschrieben (Orme et al., 2020).

Da sPD-L1 auch aus Blutserum und bei gesunden Probanden nachgewiesen werden kann, werden neben Tumorzellen alternative Quellen für sPD-L1, wie beispielsweise mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, engl.: peripheral blood mononuclear cell), vermutet (Frigola et al., 2012).

Für die Funktion dieser löslichen Formen werden gegensätzliche Effekte auf das Überleben der Tumorzelle und die Interaktion zwischen Tumorzelle und Immunzelle diskutiert. So könnte sPD-L1 agonistisch an von T-Zellen exprimiertes PD-1 binden und so eine ähnliche Funktion in der Unterdrückung der Immunantwort spielen wie die membranständige Form von PD-L1 (Orme et al., 2020). Gleichzeitig wurde beschrieben, dass sPD-L1 dazu in der Lage ist, über eine direkte Induktion der Apoptose von CD8⁺ T-Zellen die gegen Tumorzellen gerichtete Immunantwort zu unterdrücken (Hassounah et al., 2019). Zudem könnte das frei zirkulierende sPD-L1 bei Therapien mit Immuncheckpoint-Inhibitoren monoklonale PD-L1 Antikörper binden und somit ihre Wirkung neutralisieren (Gong, B. et al., 2019). Für diese Thesen spricht, dass in einigen Studien bei unterschiedlichen Tumorentitäten wie dem HCC oder dem extranodalen T-Zell-Lymphom hohe Spiegel von sPD-L1 im Serum mit einem verminderten OS assoziiert waren (Finkelmeier et al., 2016; Wang, H. et al., 2016).

Im Gegensatz dazu wurde für die durch endogene Retroelement-Exaptation entstandenen Isoformen von sPD-L1 eine antagonistische Wirkung auf das interzelluläre *Signaling* zwischen PD-L1 und PD-1 beschrieben, welche die immunsupprimierende Wirkung von PD-L1 ähnlich effizient inhibiert wie ein gegen PD-L1 gerichteter Antikörper und somit die antitumorale Immunantwort verstärkt (Ng et al., 2019). Dieser Effekt könnte bei einer Entzündungsreaktion relevant sein, im Rahmen derer eine verstärkte Immunantwort zu einer effektiveren Bekämpfung von Antigenen, wie beispielsweise Bakterien, führen könnte.

Die genaue Signalkaskade, welche die Induktion von sPD-L1 im Rahmen einer Entzündungsreaktion auslösen könnte, bleibt weiterhin ungeklärt. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zellversuchen wurden bei ausgewählten Versuchsreihen Zellkulturüberstände asserviert, um sie mittels ELISA auf das Vorhandensein von sPD-L1 zu untersuchen. Da im Rahmen einer oben beschriebenen Entzündungsreaktion in Hepatozyten IL-6-abhängig der Entzündungsmarker CRP gebildet wird (Sun et al., 2011), wurde zudem eine Induktion von PD-L1-mRNA, PD-L1 und sPD-L1 durch IL-6 in einer ccRCC- und einer HCC-Zelllinie überprüft.

Sowohl die untersuchte ccRCC-Zelllinie CaKi-1 als auch die pRCC-Zelllinie CaKi-2 sezernierten sPD-L1 in den Zellkulturüberstand, CaKi-2 jedoch in deutlich geringerem Umfang. Die zuvor beschriebene Induktion von PD-L1 durch die Zugabe von IFN- γ auf mRNA- und Proteinebene bei CaKi-1-Zellen konnte auch für sPD-L1 nachgewiesen werden. Sie zeigte sich auch bei der untersuchten HCC-Zelllinie HepG₂. Eine direkte Hochregulation von PD-L1 durch IL-6 scheint unwahrscheinlich, da sich keine Induktion von PD-L1, sPD-L1 oder PD-L1-mRNA durch Zugabe von rekombinantem IL-6 bei CaKi-1- und HepG₂-Zellen zeigte.

Ein *knock-down* von PD-L1 mithilfe von siRNA führte nicht nur zu einer verminderten PD-L1-Proteinexpression, sondern auch zu einer geringeren Menge an sPD-L1 im Zellüberstand bei CaKi-1 Zellen.

Auch nach Induktion von PD-L1 durch Zugabe von IFN- γ führte der *knock-down* von PD-L1 durch siRNA zu geringeren Mengen an in den Zellkulturüberstand abgegebenem sPD-L1. Dies spricht für eine direkte Verbindung zwischen der zellulären und der löslichen Form von PD-L1 und unterstützt die These, dass sPD-L1 von der membranständigen Form abgeleitet ist.

7.3 Bestimmung von PD-L1 mRNA und sPD-L1 aus Patientenblutproben

Obwohl die Therapie mittels Immuncheckpoint-Inhibitoren mittlerweile zum Goldstandard der Erstlinientherapie beim metastasierten RCC gehört, kommt es bei einem Großteil der auf diese Art behandelten Patienten schlussendlich zu einem Progress ihrer Erkrankung. Abgesehen davon können irAEs zu einer schwerwiegenden bis lebensbedrohlichen Toxizität der einzelnen Substanzen führen (Postow et al., 2018). Der Möglichkeit, vorherzusagen, welche Patienten am wahrscheinlichsten ein Ansprechen auf diese Therapien zeigen könnten, käme eine immense klinische Bedeutung bei. Trotz des beträchtlichen betriebenen Forschungsaufwands konnte sich bis jetzt noch keiner der untersuchten Biomarker als tauglich für die Praxis erweisen. Insbesondere der diagnostische Stellenwert der Expression von PD-L1 bleibt weiterhin unklar. In einer diesbezüglich durchgeführten Metaanalyse beim RCC hatten Patienten mit PD-L1-negativen Tumoren unter Therapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren im Vergleich zur Standardtherapie kein verlängertes PFS. Patienten mit PD-L1-positiven Tumoren hingegen profitierten in Bezug auf das PFS von gegen das PD-L1/PD-1-System gerichteten Antikörpertherapien verglichen mit der Standardtherapie. Das Gesamtüberleben konnte durch die Therapie mit gegen das PD-L1/PD-1-System gerichteten Antikörpern im Vergleich zur Standardtherapie sowohl für Patienten mit PD-L1-positiven als auch für Patienten mit PD-L1-negativen Tumoren verlängert werden, weswegen diese Therapie Patienten mit PD-L1-negativen RCCs nicht vorenthalten werden sollte (Tucker & Rini, 2020). In Bezug auf sPD-L1 konnte bis jetzt kein Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln und unterschiedlichen klinischen Outcomes beim ccRCC gezeigt werden, wohingegen sPD-L2 als Biomarker für ein Erkrankungsrezidiv diskutiert wird (Wang, Q. et al., 2019).

Im letzten Teil dieser Arbeit wurden Blutproben von Patienten, welche in der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universitätsklinik Marburg eine Tumornephrektomie erhielten, asserviert. Die Blutabnahmen erfolgten sowohl vor als auch 10-14 Tage nach Nephrektomie. Neben routinemäßig bestimmten Laborparametern wurden sPD-L1-Spiegel mittels ELISA aus dem Blutserum bestimmt. Weiterhin erfolgte die Bestimmung von PD-L1-mRNA aus Vollblut.

Lösliches PD-L1 konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der sPD-L1-Spiegel in den nach der Tumoresektion gewonnenen Blutproben, verglichen mit den vor der Tumoresektion gewonnenen Blutproben derselben Patienten. Parallel dazu wurde in den routinemäßig bestimmten Laborparametern ein signifikanter Anstieg des Entzündungsmarkers CRP im Vergleich zwischen prä- und postoperativen Blutproben derselben Patienten beobachtet. Ergänzend dazu fiel sodann auch eine hochsignifikante Korrelation zwischen sPD-L1 und CRP in den präoperativ

asservierten Blutproben auf. Zudem zeigte sich eine vergleichsweise moderate Korrelation zwischen sPD-L1-Spiegeln und aus Vollblut bestimmten Spiegeln von PD-L1-mRNA.

Postuliert man, dass das im Blutserum detektierte sPD-L1 von Tumorzellen freigesetzt wird, so scheint ein Anstieg der sPD-L1-Konzentration nach Tumorresektion unschlüssig. Abgesehen von der Beobachtung, dass Tumorzellen in der Zellkultur sPD-L1 in den Medium-Überstand sezernieren, bleibt der Ursprung von sPD-L1 ungeklärt. Die moderate Korrelation zwischen sPD-L1 und PD-L1-mRNA, nachgewiesen im Vollblut, könnte ein Indikator dafür sein, dass zumindest ein Teil des sPD-L1 im Blutserum von PBMCs abgegeben wird.

Der parallele Anstieg von sPD-L1 und CRP nach Tumorresektion könnte zudem ein Ausdruck der durch die immun-modulierende Wirkung der Reduktion der Tumorzelllast durch Nephrektomie ausgelösten Entzündungsreaktion sein (Heng, Wells et al., 2014). Auch für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom konnte gezeigt werden, dass erhöhte sPD-L1-Spiegel im Serum mit erhöhten CRP-Werten korrelierten, was die Autoren dieser Studie als Ausdruck der systemischen Entzündungsreaktion oder als Hinweis auf einen entzündlichen Tumortyp werteten (Kruger et al., 2017).

Da der Entzündungsmarker CRP, wie oben bereits beschrieben, IL-6-abhängig in Hepatozyten gebildet wird (Sun et al., 2011), wurde in der Zellkultur eine mögliche Induktion von PD-L1 und sPD-L1 an ccRCC-Zellen und HCC-Zellen überprüft. Hierbei zeigte sich, dass die Zugabe von IL-6 zu den Zellen weder Einfluss auf den PD-L1-Spiegel auf mRNA- und Proteinebene noch auf die in den Zellkultur-überstand abgegebenen Spiegel von sPD-L1 hat.

Die Beobachtung, dass die sPD-L1-Spiegel im Serum nach Tumornephrektomie erhöht waren, spricht dagegen, dass sPD-L1 als Surrogat von PD-L1 im Tumor Verwendung finden sollte - zumindest, bis klarere Ergebnisse bezüglich der Funktion und des Entstehungsortes von sPD-L1 vorliegen. Die bis dato publizierten Ergebnisse könnten in Zusammenschau mit den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen zu der Vermutung führen, dass möglicherweise mehrere unterschiedliche Formen von sPD-L1 mit unterschiedlichen Entstehungsorten und mit möglicherweise gegensätzlichen Funktionen existieren. Eine genaue Identifikation der Funktion der löslichen Formen verschiedener Immuncheckpoint-Komponenten könnte den Schlüssel zur Identifizierung von Patienten mit hohem Risiko für ein Tumorrezidiv oder mit schlechter Prognose darstellen. Gleichzeitig könnte ein genaueres Verständnis dieser Proteine zur besseren Vorhersagbarkeit der Ansprechens- und Nebenwirkungsraten von Therapien mit gegen Immuncheckpoint-Komponenten gerichteten Antikörpern führen.

7.4 Forschungsausblick

Diese Arbeit gibt Einblicke in die Regulation von PD-L1 und sPD-L1 beim RCC. Es wurden insbesondere Aspekte der Expression von PD-L1 auf den Ebenen von PD-L1-mRNA, PD-L1 Protein und der löslichen Form sPD-L1 mittels zellbiologischer und klinischer Untersuchungen erfasst. Direkte funktionell-immunologische Aspekte von sPD-L1 beim RCC, die nur teilweise verstanden und klinisch von Interesse sind, wurden hier hingegen nicht untersucht.

Hierfür könnte eine Co-Kultivierung geeigneter Tumorzellen gemeinsam mit Immunzellen (T-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten), welche die relevanten Komponenten wie PD-L1, IFN- γ -*Signaling* und andere Mediatoren exprimieren, in Betracht kommen. In solch einem System könnte die Mikroumgebung des Tumors in vitro abgebildet werden, um auch den Einfluss von z.B. rekombinantem löslichem sPD-L1 zu untersuchen.

In direkter Ergänzung wäre von Interesse, genauer zu ermitteln, von welchen verschiedenen Prozessen und Bedingungen die sPD-L1-Spiegel im Blut von Patienten mit RCC beeinflusst werden. Neben der Tumorlast, der Expression und der Regulation von PD-L1 in den malignen Zellen scheinen inflammatorisch bedingte immunologische Prozesse einen erheblichen Einfluss auf sPD-L1 im Blut zu haben. Ein genaueres Verständnis dieser Prozesse wäre entscheidend für die Rationale von sPD-L1 als möglicher Biomarker für Prognose oder Prädiktion einer Immuntherapie beim RCC.

8. Literaturverzeichnis

- Adams, K. F., Leitzmann, M. F., Albanes, D., Kipnis, V., Moore, S. C., Schatzkin, A., & Chow, W.-H. (2008). Body Size and Renal Cell Cancer Incidence in a Large US Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*, 168, 268–277.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., & Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood*, 114, 1537–1544.
- Albiges, L., Hakimi, A. A., Xie, W., McKay, R. R., Simantov, R., Lin, X., ... Choueiri, T. K. (2016). Body Mass Index and Metastatic Renal Cell Carcinoma: Clinical and Biological Correlations. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34, 3655–3663.
- Alt, A. L., Boorjian, S. A., Lohse, C. M., Costello, B. A., Leibovich, B. C., & Blute, M. L. (2011). Survival after complete surgical resection of multiple metastases from renal cell carcinoma. *Cancer*, 117, 2873–2882. r.
- Ansell, S. M., Lesokhin, A. M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E. C., Gutierrez, M., ... Armand, P. (2015). PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 372, 311–319.
- Argani, P., Laé, M., Ballard, E. T., Amin, M., Manivel, C., Hutchinson, B., ... Ladanyi, M. (2016). Translocation Carcinomas of the Kidney After Chemotherapy in Childhood. *Journal of Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.4693>
- Banumathy, G., & Cairns, P. (2010). Signaling pathways in renal cell carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, 10, 658–664.
- Barker, N., & Clevers, H. (2006). Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5, 997–1014.
- Benci, J. L., Xu, B., Qiu, Y., Wu, T. J., Dada, H., Twyman-Saint Victor, C., ... Minn, A. J. (2016). Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade. *Cell*, 167, 1540-1554.e12.
- Berger, D. P., Herbstritt, L., Dengler, W. A., Marmé, D., Mertelsmann, R., & Fiebig, H. H. (1995).

- Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human tumor models of different histologies. *Annals of Oncology*, 6, 817–825.
- Berndt, J. D., Moon, R. T., & Major, M. B. (2009). β -catenin gets jaded and von Hippel-Lindau is to blame. *Trends in Biochemical Sciences*, 34, 101–104.
- Bertucci, F., Finetti, P., Colpaert, C., Mamessier, E., Parizel, M., Dirix, L., ... van Laere, S. (2015). PDL1 expression in inflammatory breast cancer is frequent and predicts for the pathological response to chemotherapy. *Oncotarget*, 6, 13506–13519.
- Braun, G. S., Kirschner, M., Rübben, A., Wahl, R. U., Amann, K., Benesova, K., & Leipe, J. (2020). Nebenwirkungen neuer onkologischer Immuntherapien. *Der Nephrologe*, 15, 191–204.
- Breyer, J., Wirtz, R. M., Otto, W., Erben, P., Worst, T. S., Stoeck, R., ... Hartmann, A. (2018). High PDL1 mRNA expression predicts better survival of stage pT1 non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC) patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 67, 403–412.
- Brodaczewska, K. K., Szczylik, C., Fiedorowicz, M., Porta, C., & Czarnecka, A. M. (2016). Choosing the right cell line for renal cell cancer research. *Molecular Cancer*, 15, 83.
- Buchbinder, E. I., Dutcher, J. P., Daniels, G. A., Curti, B. D., Patel, S. P., Holtan, S. G., ... McDermott, D. F. (2019). Therapy with high-dose Interleukin-2 (HD IL-2) in metastatic melanoma and renal cell carcinoma following PD1 or PDL1 inhibition. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 7, 49.
- Bui, M. H. T., Visapaa, H., Seligson, D., Kim, H., Han, K.-R., Huang, Y., ... Belldegrun, A. S. (2004). Prognostic value of carbonic anhydrase IX and KI67 as predictors of survival for renal clear cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 171, 2461–2466.
- Burgess, N. A., Koo, B. C., Calvert, R. C., Hindmarsh, A., Donaldson, P. J., & Rhodes, M. (2007). Randomized trial of laparoscopic v open nephrectomy. *Journal of Endourology*, 21, 610–613.
- Burr, M. L., Sparbier, C. E., Chan, Y.-C., Williamson, J. C., Woods, K., Beavis, P. A., ... Dawson, M. A. (2017). CMTM6 maintains the expression of PD-L1 and regulates anti-tumour immunity. *Nature*, 549, 101–105.
- Calle, E. E., Rodriguez, C., Walker-Thurmond, K., & Thun, M. J. (2003). Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. *New England Journal*

- of Medicine*, 348, 1625–1638.
- Camacho, L. H. (2015). CTLA-4 blockade with ipilimumab: Biology, safety, efficacy, and future considerations. *Cancer Medicine*, 4, 661–672.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., ... Reed, J. C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 282, 1318–1321.
- Champiat, S., Lambotte, O., Barreau, E., Belkhir, R., Berdelou, A., Carbonnel, F., ... Marabelle, A. (2016). Management of immune checkpoint blockade dysimmune toxicities: A collaborative position paper. *Annals of Oncology*, 27, 559–574.
- Chandrasekar, T., Klaassen, Z., Goldberg, H., Kulkarni, G. S., Hamilton, R. J., & Fleshner, N. E. (2017). Metastatic renal cell carcinoma: Patterns and predictors of metastases-A contemporary population-based series. *Urologic Oncology*, 35, 661.e7-661.e14.
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, 39, 1–10.
- Chen, Y., Wang, Q., Shi, B., Xu, P., Hu, Z., Bai, L., & Zhang, X. (2011). Development of a sandwich ELISA for evaluating soluble PD-L1 (CD274) in human sera of different ages as well as supernatants of PD-L1+ cell lines. *Cytokine*, 56, 231–238.
- Cheungpasitporn, W., Thongprayoon, C., O’Corragain, O. A., Edmonds, P. J., Ungprasert, P., Kittanamongkolchai, W., & Erickson, S. B. (2015). The risk of kidney cancer in patients with kidney stones: A systematic review and meta-analysis. *QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians*, 108, 205–212.
- Chevinsky, M., Imnadze, M., Sankin, A., Winer, A., Mano, R., Jakubowski, C., ... Russo, P. (2015). Pathological Stage T3a Significantly Increases Disease Recurrence across All Tumor Sizes in Renal Cell Carcinoma. *The Journal of urology*, 194, 310–315.
- Chitalia, V. C., Foy, R. L., Bachschmid, M. M., Zeng, L., Panchenko, M. V., Zhou, M. I., ... Cohen, H. T. (2008). Jade-1 inhibits Wnt signalling by ubiquitylating beta-catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL. *Nature Cell Biology*, 10, 1208–1216.
- Cho, E., Curhan, G., Hankinson, S. E., Kantoff, P., Atkins, M. B., Stampfer, M., & Choueiri, T. K.

- (2011). Prospective evaluation of analgesic use and risk of renal cell cancer. *Archives of Internal Medicine*, 171, 1487–1493.
- Choi, Y., Park, B., Jeong, B. C., Seo, S. I., Jeon, S. S., Choi, H. Y., ... Lee, H. M. (2013). Body mass index and survival in patients with renal cell carcinoma: A clinical-based cohort and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, 132, 625–634.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162, 156–159.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1, 581–585.
- Choueiri, T. K., Escudier, B., Powles, T., Mainwaring, P. N., Rini, B. I., Donskov, F., ... Motzer, R. J. (2015). Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 373, 1814–1823.
- Choueiri, T. K., Halabi, S., Sanford, B. L., Hahn, O., Michaelson, M. D., Walsh, M. K., ... Morris, M. J. (2017). Cabozantinib Versus Sunitinib As Initial Targeted Therapy for Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma of Poor or Intermediate Risk: The Alliance A031203 CABOSUN Trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35, 591–597.
- Choueiri, T. K., Plimack, E., Arkenau, H.-T., Jonasch, E., Heng, D. Y. C., Powles, T., ... Pal, S. K. (2017). Biomarker-Based Phase II Trial of Savolitinib in Patients With Advanced Papillary Renal Cell Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 2993–3001.
- Chow, W. H., Devesa, S. S., Warren, J. L., & Fraumeni, J. F. (1999). Rising incidence of renal cell cancer in the United States. *JAMA*, 281, 1628–1631.
- Chuang, Y. C., Lin, A. T., Chen, K. K., Chang, Y. H., Chen, M. T., & Chang, L. S. (1997). Paraneoplastic elevation of serum alkaline phosphatase in renal cell carcinoma: Incidence and implication on prognosis. *The Journal of Urology*, 158, 1684–1687.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, 127, 469–480.

- Coelho, M. A., de Carné Trécesson, S., Rana, S., Zecchin, D., Moore, C., Molina-Arcas, M., ... Downward, J. (2017). Oncogenic RAS Signaling Promotes Tumor Immuno-resistance by Stabilizing PD-L1 mRNA. *Immunity*, 47, 1083-1099.e6.
- Cohen, D. D., Matin, S. F., Steinberg, J. R., Zagone, R., & Wood, C. G. (2005). Evaluation of the intact specimen after laparoscopic radical nephrectomy for clinically localized renal cell carcinoma identifies a subset of patients at increased risk for recurrence. *The Journal of Urology*, 173, 1487–1490; discussion 1490-1491.
- Coleman, J. A., & Russo, P. (2009). Hereditary and familial kidney cancer. *Current Opinion in Urology*, 19, 478–485.
- Coley, W. B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of Surgery*, 14, 199–220.
- Colombo, J. R., Haber, G.-P., Jelovsek, J. E., Lane, B., Novick, A. C., & Gill, I. S. (2008). Seven years after laparoscopic radical nephrectomy: Oncologic and renal functional outcomes. *Urology*, 71, 1149–1154.
- Cook, A., Lorenzo, A. J., Salle, J. L. P., Bakhshi, M., Cartwright, L. M., Bagi, D., ... Khoury, A. (2006). Pediatric renal cell carcinoma: Single institution 25-year case series and initial experience with partial nephrectomy. *The Journal of Urology*, 175, 1456–1460; discussion 1460.
- Coppin, C., Porzolt, F., Awa, A., Kumpf, J., Coldman, A., & Wilt, T. (2005). Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD001425.
- Cumberbatch, M. G., Rota, M., Catto, J. W. F., & La Vecchia, C. (2016). The Role of Tobacco Smoke in Bladder and Kidney Carcinogenesis: A Comparison of Exposures and Meta-analysis of Incidence and Mortality Risks. *European Urology*, 70, 458–466.
- Dabydeen, D. A., Jagannathan, J. P., Ramaiya, N., Krajewski, K., Schutz, F. A. B., Cho, D. C., ... Choueiri, T. K. (2012). Pneumonitis associated with mTOR inhibitors therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: Incidence, radiographic findings and correlation with clinical outcome. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 48, 1519–1524.
- Denkert, C., von Minckwitz, G., Brase, J. C., Sinn, B. V., Gade, S., Kronenwett, R., ... Loibl, S. (2015). Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary

- breast cancers. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33, 983–991.
- Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F., & Sherr, C. J. (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes & Development*, 12, 3499–3511.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., ... Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, 8, 793–800.
- Dovhey, S. E., Ghosh, N. S., Wright, K. L. (2000). Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Research*, 60, 5789–5796
- Eder, J. P., Woude, G. F. V., Boerner, S. A., & LoRusso, P. M. (2009). Novel Therapeutic Inhibitors of the c-Met Signaling Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*, 15, 2207–2214.
- Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W. M., Szczylik, C., Oudard, S., Siebels, M., ... TARGET Study Group. (2007). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 356, 125–134.
- Escudier, B., Pluzanska, A., Koralewski, P., Ravaud, A., Bracarda, S., Szczylik, C., ... AVOREN Trial investigators. (2007). Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: A randomised, double-blind phase III trial. *Lancet (London, England)*, 370, 2103–2111.
- Escudier, B., Porta, C., Bono, P., Powles, T., Eisen, T., Sternberg, C. N., ... Cella, D. (2014). Randomized, controlled, double-blind, cross-over trial assessing treatment preference for pazopanib versus sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma: PISCES Study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32, 1412–1418.
- Escudier, B., Porta, C., Schmidinger, M., Rioux-Leclercq, N., Bex, A., Khoo, V., ... Horwich, A. (2019). Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 30, 706–720.
- Escudier, B., Szczylik, C., Hutson, T. E., Demkow, T., Staehler, M., Rolland, F., ... Bukowski, R. M. (2009). Randomized phase II trial of first-line treatment with sorafenib versus interferon Alfa-

- 2a in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27, 1280–1289.
- Ferguson, T. A., Choi, J., & Green, D. R. (2011). Armed response: How dying cells influence T-cell functions. *Immunological Reviews*, 241, 77–88.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W. W., Comber, H., ... Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 49, 1374–1403.
- Finkelmeier, F., Canli, Ö., Tal, A., Pleli, T., Trojan, J., Schmidt, M., ... Waidmann, O. (2016). High levels of the soluble programmed death-ligand (sPD-L1) identify hepatocellular carcinoma patients with a poor prognosis. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 59, 152–159.
- Fischer, J., Palmedo, G., von Knobloch, R., Bugert, P., Prayer-Galetti, T., Pagano, F., & Kovacs, G. (1998). Duplication and overexpression of the mutant allele of the MET proto-oncogene in multiple hereditary papillary renal cell tumours. *Oncogene*, 17, 733–739.
- Flaherty, K. T., Manola, J. B., Pins, M., McDermott, D. F., Atkins, M. B., Dutcher, J. J., ... DiPaola, R. S. (2015). BEST: A Randomized Phase II Study of Vascular Endothelial Growth Factor, RAF Kinase, and Mammalian Target of Rapamycin Combination Targeted Therapy With Bevacizumab, Sorafenib, and Temsirolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma--A Trial of the ECOG-ACRIN Cancer Research Group (E2804). *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33, 2384–2391.
- Franciszkieicz, K., Boissonnas, A., Boutet, M., Combadière, C., & Mami-Chouaib, F. (2012). Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Research*, 72, 6325–6332.
- Frigola, X., Inman, B. A., Krco, C. J., Liu, X., Harrington, S. M., Bulur, P. A., ... Kwon, E. D. (2012). Soluble B7-H1: Differences in production between dendritic cells and T cells. *Immunology letters*, 142, 78–82.
- Furge, K. A., Chen, J., Koeman, J., Swiatek, P., Dykema, K., Lucin, K., ... Teh, B. T. (2007). Detection of DNA Copy Number Changes and Oncogenic Signaling Abnormalities from Gene Expression

- Data Reveals MYC Activation in High-Grade Papillary Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research*, 67, 3171–3176.
- Fyfe, G., Fisher, R. I., Rosenberg, S. A., Sznol, M., Parkinson, D. R., & Louie, A. C. (1995). Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 13, 688–696.
- Gao, J., Shi, L. Z., Zhao, H., Chen, J., Xiong, L., He, Q., ... Sharma, P. (2016). Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell*, 167, 397-404.e9.
- Glodde, N., & Hölzel, M. (2017). RAS and PD-L1: A Masters' Liaison in Cancer Immune Evasion. *Immunity*, 47, 1007–1009.
- Gnarra, J. R., Glenn, G. M., Latif, F., Anglard, P., Lerman, M. I., Zbar, B., & Linehan, W. M. (1993). Molecular genetic studies of sporadic and familial renal cell carcinoma. *The Urologic Clinics of North America*, 20, 207–216.
- Gold, P. J., Fefer, A., & Thompson, J. A. (1996). Paraneoplastic manifestations of renal cell carcinoma. *Seminars in Urologic Oncology*, 14, 216–222.
- Golshayan, A. R., George, S., Heng, D. Y. C., Elson, P., Wood, L. S., Mekhail, T. M., ... Rini, B. I. (2009). Metastatic sarcomatoid renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27, 235–241.
- Gong, A.-Y., Zhou, R., Hu, G., Li, X., Splinter, P. L., O'Hara, S. P., ... Chen, X.-M. (2009). MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN-gamma-induced B7-H1 expression in cholangiocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 182, 1325–1333.
- Gong, B., Kiyotani, K., Sakata, S., Nagano, S., Kumehara, S., Baba, S., ... Katayama, R. (2019). Secreted PD-L1 variants mediate resistance to PD-L1 blockade therapy in non-small cell lung cancer. *Journal of Experimental Medicine*, 216, 982–1000.
- Gordon, S. C., Moonka, D., Brown, K. A., Rogers, C., Huang, M. A. Y., Bhatt, N., & Lamerato, L. (2010). Risk for Renal Cell Carcinoma in Chronic Hepatitis C Infection. *Cancer Epidemiology*

- and Prevention Biomarkers*, 19, 1066–1073.
- Gore, M. E., Griffin, C. L., Hancock, B., Patel, P. M., Pyle, L., Aitchison, M., ... Mulders, P. F. (2010). Interferon alfa-2a versus combination therapy with interferon alfa-2a, interleukin-2, and fluorouracil in patients with untreated metastatic renal cell carcinoma (MRC RE04/EORTC GU 30012): An open-label randomised trial. *The Lancet*, 375, 641–648.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177, 751–766.
- Grimm, M.-O., Schmidinger, M., Martinez, I. D., Schinzari, G., Esteban, E., Schmitz, M., ... Albiges, L. (2019). Tailored immunotherapy approach with nivolumab in advanced renal cell carcinoma (TITAN-RCC). *Annals of Oncology*, 30, v892.
- Grubb, R. L., Franks, M. E., Toro, J., Middleton, L., Choyke, L., Fowler, S., ... Linehan, W. M. (2007). Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: A syndrome associated with an aggressive form of inherited renal cancer. *The Journal of Urology*, 177, 2074–2079; discussion 2079–2080.
- Guo, G., Gui, Y., Gao, S., Tang, A., Hu, X., Huang, Y., ... Wang, J. (2011). Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. *Nature Genetics*, 44, 17–19.
- Hammers, H. J., Plimack, E. R., Infante, J. R., Rini, B. I., McDermott, D. F., Lewis, L. D., ... Amin, A. (2017). Safety and Efficacy of Nivolumab in Combination With Ipilimumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma: The CheckMate 016 Study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 35, 3851–3858.
- Hänze, J., Wegner, M., Noessner, E., Hofmann, R., & Hegele, A. (2020). Co-Regulation of Immune Checkpoint PD-L1 with Interferon-Gamma Signaling is Associated with a Survival Benefit in Renal Cell Cancer. *Targeted Oncology*, 15, 377–390.
- Hara, S., Oya, M., Mizuno, R., Horiguchi, A., Marumo, K., & Murai, M. (2005). Akt activation in renal cell carcinoma: Contribution of a decreased PTEN expression and the induction of apoptosis by an Akt inhibitor. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 16, 928–933.
- Harshman, L. C., & Choueiri, T. K. (2013). Targeting the hepatocyte growth factor/c-Met signaling

- pathway in renal cell carcinoma. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, 19, 316–323.
- Hassounah, N. B., Malladi, V. S., Huang, Y., Freeman, S. S., Beauchamp, E. M., Koyama, S., ... Akbay, E. A. (2019). Identification and characterization of an alternative cancer-derived PD-L1 splice variant. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68, 407–420.
- Heng, D. Y. C., Choueiri, T. K., Rini, B. I., Lee, J., Yuasa, T., Pal, S. K., ... Wood, L. A. (2014). Outcomes of patients with metastatic renal cell carcinoma that do not meet eligibility criteria for clinical trials. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 25, 149–154.
- Heng, D. Y. C., Wells, J. C., Rini, B. I., Beuselinck, B., Lee, J.-L., Knox, J. J., ... Choueiri, T. K. (2014). Cytoreductive nephrectomy in patients with synchronous metastases from renal cell carcinoma: Results from the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium. *European Urology*, 66, 704–710.
- Heng, D. Y. C., Xie, W., Regan, M. M., Harshman, L. C., Bjarnason, G. A., Vaishampayan, U. N., ... Choueiri, T. K. (2013). External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: A population-based study. *The Lancet. Oncology*, 14, 141–148.
- Heng, D. Y. C., Xie, W., Regan, M. M., Warren, M. A., Golshayan, A. R., Sahi, C., ... Choueiri, T. K. (2009). Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: Results from a large, multicenter study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27, 5794–5799.
- Hollingsworth, J. M., Miller, D. C., Daignault, S., & Hollenbeck, B. K. (2006). Rising incidence of small renal masses: A need to reassess treatment effect. *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 1331–1334.
- Huang, W. C., Levey, A. S., Serio, A. M., Snyder, M., Vickers, A. J., Raj, G. V., ... Russo, P. (2006). Chronic kidney disease after nephrectomy in patients with renal cortical tumours: A retrospective cohort study. *The Lancet. Oncology*, 7, 735–740.
- Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., ... Global ARCC Trial.

- (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 356, 2271–2281.
- Hutson, T. E., Escudier, B., Esteban, E., Bjarnason, G. A., Lim, H. Y., Pittman, K. B., ... Motzer, R. J. (2014). Randomized Phase III Trial of Temsirolimus Versus Sorafenib As Second-Line Therapy After Sunitinib in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 32, 760–767.
- Hutson, T. E., Figlin, R. A., Kuhn, J. G., & Motzer, R. J. (2008). Targeted therapies for metastatic renal cell carcinoma: An overview of toxicity and dosing strategies. *The Oncologist*, 13, 1084–1096.
- Iacovelli, R., Nolè, F., Verri, E., Renne, G., Paglino, C., Santoni, M., ... Porta, C. (2016). Prognostic Role of PD-L1 Expression in Renal Cell Carcinoma. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Targeted Oncology*, 11, 143–148.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., ... Guan, K.-L. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*, 126, 955–968.
- Jiang, Z., Chu, P. G., Woda, B. A., Rock, K. L., Liu, Q., Hsieh, C.-C., ... Wu, C.-L. (2006). Analysis of RNA-binding protein IMP3 to predict metastasis and prognosis of renal-cell carcinoma: A retrospective study. *The Lancet. Oncology*, 7, 556–564.
- Kaelin, W. G. (2005). The von Hippel-Lindau protein, HIF hydroxylation, and oxygen sensing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 627–638.
- Kalbasi, A., & Ribas, A. (2020). Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade. *Nature Reviews. Immunology*, 20, 25–39.
- Kane, C. J., Mallin, K., Ritchey, J., Cooperberg, M. R., & Carroll, P. R. (2008). Renal cell cancer stage migration: Analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer*, 113, 78–83.
- Kapur, P., Peña-Llopis, S., Christie, A., Zhrebker, L., Pavía-Jiménez, A., Rathmell, W. K., ... Brugarolas, J. (2013). Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: A retrospective analysis with independent validation. *The Lancet. Oncology*, 14, 159–167.
- Kim, A. H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T. F., & Chao, M. V. (2001). Akt phosphorylates and

- negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Molecular and Cellular Biology*, 21, 893–901.
- Kim, Y. S., Kang, Y. K., Kim, J. B., Han, S. A., Kim, K. I., & Paik, S. R. (2000). Beta-catenin expression and mutational analysis in renal cell carcinomas. *Pathology International*, 50, 725–730.
- Klatte, T., Seligson, D. B., Riggs, S. B., Leppert, J. T., Berkman, M. K., Kleid, M. D., ... Belldegrun, A. S. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 13, 7388–7393.
- Knox, J. J., Barrios, C. H., Kim, T. M., Cosgriff, T., Srimuninnimit, V., Pittman, K., ... Motzer, R. J. (2017). Final overall survival analysis for the phase II RECORD-3 study of first-line everolimus followed by sunitinib versus first-line sunitinib followed by everolimus in metastatic RCC. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 28, 1339–1345.
- Kosari, F., Parker, A. S., Kube, D. M., Lohse, C. M., Leibovich, B. C., Blute, M. L., ... Vasmataz, G. (2005). Clear cell renal cell carcinoma: Gene expression analyses identify a potential signature for tumor aggressiveness. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 11, 5128–5139.
- Kruger, S., Legenstein, M.-L., Rösger, V., Haas, M., Modest, D. P., Westphalen, C. B., ... Boeck, S. (2017). Serum levels of soluble programmed death protein 1 (sPD-1) and soluble programmed death ligand 1 (sPD-L1) in advanced pancreatic cancer. *Oncoimmunology*, 6, e1310358.
- Kuczyk, M., Münch, T., Machtens, S., Bokemeyer, C., Wefer, A., Hartmann, J., ... Jonas, U. (2002). The need for routine adrenalectomy during surgical treatment for renal cell cancer: The Hannover experience. *BJU International*, 89, 517–522.
- La Rochelle, J., Klatte, T., Dastane, A., Rao, N., Seligson, D., Said, J., ... Pantuck, A. J. (2010). Chromosome 9p deletions identify an aggressive phenotype of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*, 116, 4696–4702.
- Lamb, G. W. A., Bromwich, E. J., Vasey, P., & Aitchison, M. (2004). Management of renal masses in patients medically unsuitable for nephrectomy—Natural history, complications, and outcome.

- Urology*, 64, 909–913.
- Leibovich, B. C., Lohse, C. M., Crispen, P. L., Boorjian, S. A., Thompson, R. H., Blute, M. L., & Cheville, J. C. (2010). Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 183, 1309–1315.
- Leicht, D. T., Balan, V., Kaplun, A., Singh-Gupta, V., Kaplun, L., Dobson, M., & Tzivion, G. (2007). Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1773, 1196–1212.
- Li, G., Feng, G., Gentil-Perret, A., Genin, C., & Tostain, J. (2008). Serum carbonic anhydrase 9 level is associated with postoperative recurrence of conventional renal cell cancer. *The Journal of Urology*, 180, 510–513; discussion 513-514.
- Lindblad, P. (2004). Epidemiology of renal cell carcinoma. *Scandinavian Journal of Surgery: SJS: Official Organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society*, 93, 88–96.
- Linehan, W. M., Rubin, J. S., & Bottaro, D. P. (2009). VHL Loss of Function and Its Impact on Oncogenic Signaling Networks in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41, 753–756.
- Lippitz, B. E. (2013). Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review. *The Lancet. Oncology*, 14, e218-228.
- Ljungberg, B., Albiges, L., Abu-Ghanem, Y., Bensalah, K., Dabestani, S., Fernández-Pello, S., ... Bex, A. (2019). European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *European Urology*, 75, 799–810.
- Looyenga, B. D., Furge, K. A., Dykema, K. J., Koeman, J., Swiatek, P. J., Giordano, T. J., ... MacKeigan, J. P. (2011). Chromosomal amplification of leucine-rich repeat kinase-2 (LRRK2) is required for oncogenic MET signaling in papillary renal and thyroid carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 1439–1444.
- Luciani, L. G., Cestari, R., & Tallarigo, C. (2000). Incidental renal cell carcinoma-age and stage characterization and clinical implications: Study of 1092 patients (1982-1997). *Urology*, 56, 58–62.
- Lutz, S., Balboni, T., Jones, J., Lo, S., Petit, J., Rich, S. E., ... Hahn, C. (2017). Palliative radiation

- therapy for bone metastases: Update of an ASTRO Evidence-Based Guideline. *Practical Radiation Oncology*, 7, 4–12.
- Mahoney, K. M., Shukla, S. A., Patsoukis, N., Chaudhri, A., Browne, E. P., Arazi, A., ... Freeman, G. J. (2019). A secreted PD-L1 splice variant that covalently dimerizes and mediates immunosuppression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68, 421–432.
- Malouf, G. G., Camparo, P., Molinié, V., Dedet, G., Oudard, S., Schleiermacher, G., ... Escudier, B. (2011). Transcription factor E3 and transcription factor EB renal cell carcinomas: Clinical features, biological behavior and prognostic factors. *The Journal of Urology*, 185, 24–29.
- Mandel, J. S., McLaughlin, J. K., Schlehofer, B., Mellemgaard, A., Helmert, U., Lindblad, P., ... Adami, H. O. (1995). International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *International Journal of Cancer*, 61, 601–605.
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., & Kolch, W. (2011). Raf Family Kinases. *Genes & Cancer*, 2, 232–260.
- McDermott, D. F., Huseni, M. A., Atkins, M. B., Motzer, R. J., Rini, B. I., Escudier, B., ... Powles, T. (2018). Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. *Nature Medicine*, 24, 749–757.
- McDermott, D. F., Lee, J.-L., Szczylik, C., Donskov, F., Malik, J., Alekseev, B. Y., ... Atkins, M. B. (2018). Pembrolizumab monotherapy as first-line therapy in advanced clear cell renal cell carcinoma (ccRCC): Results from cohort A of KEYNOTE-427. *Journal of Clinical Oncology*, 36, 4500–4500.
- Mekhail, T. M., Abou-Jawde, R. M., Boumerhi, G., Malhi, S., Wood, L., Elson, P., & Bukowski, R. (2005). Validation and extension of the Memorial Sloan-Kettering prognostic factors model for survival in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23, 832–841.
- Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480, 480–489.
- Messai, Y., Gad, S., Noman, M. Z., Le Teuff, G., Couve, S., Janji, B., ... Chouaib, S. (2016). Renal Cell

- Carcinoma Programmed Death-ligand 1, a New Direct Target of Hypoxia-inducible Factor-2 Alpha, is Regulated by von Hippel-Lindau Gene Mutation Status. *European Urology*, 70, 623–632.
- Monga, S. P. S., Mars, W. M., Pediaditakis, P., Bell, A., Mulé, K., Bowen, W. C., ... Michalopoulos, G. K. (2002). Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Research*, 62, 2064–2071.
- Morris, M. R., Hughes, D. J., Tian, Y.-M., Ricketts, C. J., Lau, K. W., Gentle, D., ... Maher, E. R. (2009). Mutation analysis of hypoxia-inducible factors HIF1A and HIF2A in renal cell carcinoma. *Anticancer Research*, 29, 4337–4343.
- Motzer, R. J., Escudier, B., McDermott, D. F., George, S., Hammers, H. J., Srinivas, S., ... Sharma, P. (2015). Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma. *The New England journal of medicine*, 373, 1803–1813.
- Motzer, R. J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T. E., Porta, C., Bracarda, S., ... RECORD-1 Study Group. (2010). Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: Final results and analysis of prognostic factors. *Cancer*, 116, 4256–4265.
- Motzer, R. J., Escudier, B., Tomczak, P., Hutson, T. E., Michaelson, M. D., Negrier, S., ... Rini, B. I. (2013). Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: Overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 14, 552–562.
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Cella, D., Reeves, J., Hawkins, R., Guo, J., ... Choueiri, T. K. (2013). Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 369, 722–731.
- Motzer, R. J., Hutson, T. E., Tomczak, P., Michaelson, M. D., Bukowski, R. M., Oudard, S., ... Figlin, R. A. (2009). Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27, 3584–3590.
- Motzer, R. J., Mazumdar, M., Bacik, J., Berg, W., Amsterdam, A., & Ferrara, J. (1999). Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical*

- Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17, 2530–2540.
- Motzer, R. J., Penkov, K., Haanen, J., Rini, B., Albiges, L., Campbell, M. T., ... Choueiri, T. K. (2019). Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 380, 1103–1115.
- Motzer, R. J., Rini, B. I., McDermott, D. F., Arén Frontera, O., Hammers, H. J., Carducci, M. A., ... CheckMate 214 investigators. (2019). Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: Extended follow-up of efficacy and safety results from a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 20, 1370–1385.
- Naidoo, J., Page, D. B., Li, B. T., Connell, L. C., Schindler, K., Lacouture, M. E., ... Wolchok, J. D. (2015). Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Annals of Oncology*, 26, 2375–2391.
- Najjar, Y. G., Mittal, K., Elson, P., Wood, L., Garcia, J. A., Dreicer, R., & Rini, B. I. (2014). A 2 weeks on and 1 week off schedule of sunitinib is associated with decreased toxicity in metastatic renal cell carcinoma. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 50, 1084–1089.
- National Cancer Institute. (2016). Kidney and Renal Pelvis Cancer—Cancer Stat Facts. Abgerufen 4. Januar 2021, von SEER Cancer Stat Facts: Kidney and Renal Pelvis Cancer website: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/kidrp.html>
- Ng, K. W., Attig, J., Young, G. R., Ottina, E., Papamichos, S. I., Kotsianidis, I., & Kassiotis, G. (2019). Soluble PD-L1 generated by endogenous retroelement exaptation is a receptor antagonist. *eLife*, 8, e50256.
- Ning, X., Gong, Y., He, S., Li, T., Wang, J., Peng, S., ... Gong, K. (2016). Higher programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) mRNA level in clear cell renal cell carcinomas is associated with a favorable outcome due to the active immune responses in tumor tissues. *Oncotarget*, 8, 3355–3363.
- Novara, G., Martignoni, G., Artibani, W., & Ficarra, V. (2007). Grading systems in renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 177, 430–436.
- Nusse, R., & Varmus, H. E. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31, 99–109.

- Oaks, M. K., & Hallett, K. M. (2000). Cutting edge: A soluble form of CTLA-4 in patients with autoimmune thyroid disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 164, 5015–5018.
- Oka, H., Chatani, Y., Hoshino, R., Ogawa, O., Kakehi, Y., Terachi, T., ... Yoshida, O. (1995). Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma. *Cancer Research*, 55, 4182–4187.
- Ooi, A., Dykema, K., Ansari, A., Petillo, D., Snider, J., Kahnoski, R., ... Furge, K. A. (2013). CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma. *Cancer Research*, 73, 2044–2051.
- Ooi, A., Wong, J.-C., Petillo, D., Roossien, D., Perrier-Trudova, V., Whitten, D., ... Furge, K. A. (2011). An antioxidant response phenotype shared between hereditary and sporadic type 2 papillary renal cell carcinoma. *Cancer Cell*, 20, 511–523.
- Orme, J. J., Jazieh, K. A., Xie, T., Harrington, S., Liu, X., Ball, M., ... Dong, H. (2020). ADAM10 and ADAM17 cleave PD-L1 to mediate PD-(L)1 inhibitor resistance. *Oncoimmunology*, 9. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1744980>
- Oudard, S., Banu, E., Vieillefond, A., Fournier, L., Priou, F., Medioni, J., ... GETUG (Groupe d'Etudes des Tumeurs Uro-Génitales). (2007). Prospective multicenter phase II study of gemcitabine plus platinum salt for metastatic collecting duct carcinoma: Results of a GETUG (Groupe d'Etudes des Tumeurs Uro-Génitales) study. *The Journal of Urology*, 177, 1698–1702.
- Pantuck, A. J., Zisman, A., & Belldegrun, A. S. (2001). The changing natural history of renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 166, 1611–1623.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 12, 252–264.
- Patard, J.-J., Dorey, F. J., Cindolo, L., Ficarra, V., De la taille, A., Tostain, J., ... Pantuck, A. J. (2004). Symptomas as well as Tumor Size provide prognostic Information on Patients with localized renal tumors. *The Journal of Urology*, 172, 2167–2171.
- Patard, J.-J., Leray, E., Rioux-Leclercq, N., Cindolo, L., Ficarra, V., Zisman, A., ... Pantuck, A. J. (2005). Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: A multicenter experi-

- ence. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23, 2763–2771.
- Pavlovich, C. P., & Schmidt, L. S. (2004). Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. *Nature Reviews. Cancer*, 4, 381–393.
- Peña-Llopis, S., Vega-Rubín-de-Celis, S., Liao, A., Leng, N., Pavía-Jiménez, A., Wang, S., ... Brugarolas, J. (2012). BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nature Genetics*, 44, 751–759.
- Peruzzi, B., Athauda, G., & Bottaro, D. P. (2006). The von Hippel–Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic β -catenin signaling in renal carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 14531–14536.
- Pinals, R. S., & Krane, S. M. (1962). Medical Aspects of Renal Carcinoma. *Postgraduate Medical Journal*, 38, 507–519.
- Postow, M. A., Sidlow, R., & Hellmann, M. D. (2018). Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *The New England Journal of Medicine*, 378, 158–168.
- Pulkkanen, K. J., Parkkinen, J. J., Laukkanen, J. M., Kettunen, M. I., Tyynela, K., Kauppinen, R. A., ... Yla-Herttuala, S. (2001). HSV-tk gene therapy for human renal cell carcinoma in nude mice. *Cancer Gene Therapy*, 8, 529–536.
- Qu, Q.-X., Xie, F., Huang, Q., & Zhang, X.-G. (2017) Membranous and Cytoplasmic Expression of PD-L1 in Ovarian Cancer Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 43, 1893-1906.
- Rabinovitch, R. A., Zelefsky, M. J., Gaynor, J. J., & Fuks, Z. (1994). Patterns of failure following surgical resection of renal cell carcinoma: Implications for adjuvant local and systemic therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 12, 206–212.
- Ranpura, V., Hapani, S., & Wu, S. (2011). Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: A meta-analysis. *JAMA*, 305, 487–494.
- Rini, B. I., Halabi, S., Rosenberg, J. E., Stadler, W. M., Vaena, D. A., Archer, L., ... Small, E. J. (2010). Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients

- with metastatic renal cell carcinoma: Final results of CALGB 90206. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28, 2137–2143.
- Rini, B. I., McKiernan, J. M., & Chang, S. S. (2017). Kidney. In M. B. Amin, American Joint Committee on Cancer, & American Cancer Society (Hrsg.), *AJCC cancer staging manual* (Eight edition / editor-in-chief, Mahul B. Amin, MD, FACS ; editors, Stephen B. Edge, MD, FACS [and 16 others] ; Donna M. Gress, RHIT, CTR-Technical editor ; Laura R. Meyer, CAPM-Managing editor, S. 739). Chicago IL: American Joint Committee on Cancer, Springer.
- Rini, B. I., Plimack, E. R., Stus, V., Gafanov, R., Hawkins, R., Nosov, D., ... KEYNOTE-426 Investigators. (2019). Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 380, 1116–1127.
- Ritchie, A., & Chisholm, G. (1983). The natural history of renal carcinoma. *Seminars in oncology*. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:0093775483900489>
- Robert-Koch-Institut, & Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019). *Krebs in Deutschland 2015/2016*. Robert Koch-Institut.
- Rübben, H. (Hrsg.). (2014). *Uroonkologie* (6. Aufl.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Sanchez, A., Furberg, H., Kuo, F., Vuong, L., Ged, Y., Patil, S., ... Hakimi, A. A. (2020). Transcriptomic signatures related to the obesity paradox in patients with clear cell renal cell carcinoma: A cohort study. *The Lancet. Oncology*, 21, 283–293.
- Sansom, D. M. (2000). CD28, CTLA-4 and their ligands: Who does what and to whom? *Immunology*, 101, 169–177.
- Sansom, O. J., Griffiths, D. F. R., Reed, K. R., Winton, D. J., & Clarke, A. R. (2005). Apc deficiency predisposes to renal carcinoma in the mouse. *Oncogene*, 24, 8205–8210.
- Santos Arrontes, D., Fernández Aceñero, M. J., García González, J. I., Martín Muñoz, M., & Paniagua Andrés, P. (2008). Survival analysis of clear cell renal carcinoma according to the Charlson comorbidity index. *The Journal of Urology*, 179, 857–861.
- Satelli, A., Bath, I. S., Brownlee, Z., Rojas, C., Meng, Q. H., Kopetz, S., & Li, S. (2016). Potential role of nuclear PD-L1 expression in cell-surface vimentin positive circulating tumor cells as a prognostic marker in cancer patients. *Scientific reports*, 6, 28910

- Schardt, J. (2020). Der Einsatz von Immunecheckpoint-Inhibitoren im onkologischen Alltag. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 79, 809–817.
- Scherr, A. J. O., Lima, J. P. S. N., Sasse, E. C., Lima, C. S. P., & Sasse, A. D. (2011). Adjuvant therapy for locally advanced renal cell cancer: A systematic review with meta-analysis. *BMC Cancer*, 11, 115.
- Schmidt, L., Nickerson, M. L., Angeloni, D., Glenn, G. M., Walther, M. M., Albert, P. S., ... Linehan, W. M. (2004). Early onset hereditary papillary renal carcinoma: Germline missense mutations in the tyrosine kinase domain of the met proto-oncogene. *The Journal of Urology*, 172, 1256–1261.
- Schutz, F. A. B., Je, Y., Richards, C. J., & Choueiri, T. K. (2012). Meta-analysis of randomized controlled trials for the incidence and risk of treatment-related mortality in patients with cancer treated with vascular endothelial growth factor tyrosine kinase inhibitors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 30, 871–877.
- Setiawan, V. W., Stram, D. O., Nomura, A. M. Y., Kolonel, L. N., & Henderson, B. E. (2007). Risk factors for renal cell cancer: The multiethnic cohort. *American Journal of Epidemiology*, 166, 932–940.
- Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., & Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, 168, 707–723.
- Shin, D. S., Zaretsky, J. M., Escuin-Ordinas, H., Garcia-Diaz, A., Hu-Lieskovan, S., Kalbasi, A., ... Ribas, A. (2017). Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discovery*, 7, 188–201.
- Shinojima, T., Oya, M., Takayanagi, A., Mizuno, R., Shimizu, N., & Murai, M. (2007). Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2alpha. *Carcinogenesis*, 28, 529–536.
- Siddiqui, S. A., Frank, I., Leibovich, B. C., Cheville, J. C., Lohse, C. M., Zincke, H., & Blute, M. L. (2007). Impact of tumor size on the predictive ability of the pT3a primary tumor classification for renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 177, 59–62.
- Siemer, S., Hack, M., Lehmann, J., Becker, F., & Stöckle, M. (2006). Outcome of renal tumors in young

- adults. *The Journal of Urology*, 175, 1240–1243; discussion 1243-1244.
- Siemer, S., Lehmann, J., Loch, A., Becker, F., Stein, U., Schneider, G., ... Stöckle, M. (2005). Current TNM classification of renal cell carcinoma evaluated: Revising stage T3a. *The Journal of Urology*, 173, 33–37.
- Simon, I., Zhuo, S., Corral, L., Diamandis, E. P., Sarno, M. J., Wolfert, R. L., & Kim, N. W. (2006). B7-h4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer. *Cancer Research*, 66, 1570–1575.
- Sinha, R., Winer, A. G., Chevinsky, M., Jakubowski, C., Chen, Y.-B., Dong, Y., ... Hakimi, A. A. (2017). Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection. *Nature Communications*, 8, 15165.
- Sivendran, S., Liu, Z., Portas, L. J., Yu, M., Hahn, N., Sonpavde, G., ... Galsky, M. D. (2012). Treatment-related mortality with vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with advanced solid tumors: A meta-analysis. *Cancer Treatment Reviews*, 38, 919–925.
- Skinner, D. G., Colvin, R. B., Vermillion, C. D., Pfister, R. C., & Leadbetter, W. F. (1971). Diagnosis and management of renal cell carcinoma. A clinical and pathologic study of 309 cases. *Cancer*, 28, 1165–1177.
- Sperduto, P. W., Deegan, B. J., Li, J., Jethwa, K. R., Brown, P. D., Lockney, N., ... Mehta, M. P. (2018). Estimating survival for renal cell carcinoma patients with brain metastases: An update of the Renal Graded Prognostic Assessment tool. *Neuro-Oncology*, 20, 1652–1660.
- Sternberg, C. N., Davis, I. D., Mardiak, J., Szczylik, C., Lee, E., Wagstaff, J., ... Hawkins, R. E. (2010). Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: Results of a randomized phase III trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28, 1061–1068.
- Störkel, S., Eble, J. N., Adlakha, K., Amin, M., Blute, M. L., Bostwick, D. G., ... Iczkowski, K. (1997). Classification of renal cell carcinoma: Workgroup No. 1. Union Internationale Contre le Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC). *Cancer*, 80, 987–989.
- Sudarshan, S., Sourbier, C., Kong, H.-S., Block, K., Valera Romero, V. A., Yang, Y., ... Neckers, L.

- (2009). Fumarate hydratase deficiency in renal cancer induces glycolytic addiction and hypoxia-inducible transcription factor 1alpha stabilization by glucose-dependent generation of reactive oxygen species. *Molecular and Cellular Biology*, 29, 4080–4090.
- Sun, H., Zhang, Y., Gao, P., Li, Q., Sun, Y., Zhang, J., & Xu, C. (2011). Adiponectin reduces C-reactive protein expression and downregulates STAT3 phosphorylation induced by IL-6 in HepG2 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 347, 183–189.
- Taube, J. M., Anders, R. A., Young, G. D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T. L., ... Chen, L. (2012). Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Science Translational Medicine*, 4, 127ra37.
- Teng, M. W. L., Ngiow, S. F., Ribas, A., & Smyth, M. J. (2015). Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Research*, 75, 2139–2145.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. (2016). Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 374, 135–145.
- Thoenes, W., Störkel, S., Rumpelt, H. J., Moll, R., Baum, H. P., & Werner, S. (1988). Chromophobe cell renal carcinoma and its variants—A report on 32 cases. *The Journal of Pathology*, 155, 277–287.
- Thompson, R. H., & Kwon, E. D. (2006). Significance of B7-H1 Overexpression in Kidney Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*, 5, 206–211.
- Thompson, R. H., Ordonez, M. A., Iasonos, A., Secin, F. P., Guillonneau, B., Russo, P., & Touijer, K. (2008). Renal Cell Carcinoma in young an old Patients: Is there a Difference? *The Journal of urology*, 180, 1262–1266.
- Tomlinson, I. P. M., Alam, N. A., Rowan, A. J., Barclay, E., Jaeger, E. E. M., Kelsell, D., ... Multiple Leiomyoma Consortium. (2002). Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nature Genetics*, 30, 406–410.
- Touloupidis, S., Papathanasiou, A., Kalaitzis, C., Fatles, G., Manavis, I., & Rombis, V. (2006). Renal cell carcinoma: The influence of new diagnostic imaging techniques on the size and stage of

- tumors diagnosed over the past 26 years. *International Urology and Nephrology*, 38, 193–197.
- Truong, L. D., Krishnan, B., Cao, J. T., Barrios, R., & Suki, W. N. (1995). Renal neoplasm in acquired cystic kidney disease. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 26, 1–12.
- Tsivian, M., Moreira, D. M., Caso, J. R., Mouraviev, V., & Polascik, T. J. (2011). Cigarette smoking is associated with advanced renal cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29, 2027–2031.
- Tsui, K. H., Shvarts, O., Smith, R. B., Figlin, R. A., deKernion, J. B., & Belldegrun, A. (2000). Prognostic indicators for renal cell carcinoma: A multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *The Journal of Urology*, 163, 1090–1095; quiz 1295.
- Tucker, M. D., & Rini, B. I. (2020). Predicting Response to Immunotherapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Cancers*, 12, 2662.
- Uhlman, D. L., Nguyen, P. L., Manivel, J. C., Aeppli, D., Resnick, J. M., Fraley, E. E., ... Niehans, G. A. (1994). Association of Immunohistochemical Staining for p53 With Metastatic Progression and Poor Survival in Patients With Renal Cell Carcinoma. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 86, 1470–1475.
- van Houwelingen, K. P., van Dijk, B. A. C., Hulsbergen-van de Kaa, C. A., Schouten, L. J., Gorissen, H. J. M., Schalken, J. A., ... Oosterwijk, E. (2005). Prevalence of von Hippel-Lindau gene mutations in sporadic renal cell carcinoma: Results from The Netherlands cohort study. *BMC Cancer*, 5, 57.
- Van Poppel, H., Da Pozzo, L., Albrecht, W., Matveev, V., Bono, A., Borkowski, A., ... Sylvester, R. (2011). A prospective, randomised EORTC intergroup phase 3 study comparing the oncologic outcome of elective nephron-sparing surgery and radical nephrectomy for low-stage renal cell carcinoma. *European Urology*, 59, 543–552.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques*, 44, 619–626.
- Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C. K., Stephens, P., ... Futreal, P. A. (2011). Exome

- sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature*, 469, 539–542.
- Verhagen, J., Sabatos, C. A., & Wraith, D. C. (2008). The role of CTLA-4 in immune regulation. *Immunology Letters*, 115, 73–74.
- Verhoest, G., Avakian, R., Bensalah, K., Thuret, R., Ficarra, V., Artibani, W., ... Patard, J.-J. (2009). Urinary collecting system invasion is an independent prognostic factor of organ confined renal cell carcinoma. *The Journal of Urology*, 182, 854–859.
- Verine, J., Pluvinage, A., Bousquet, G., Lehmann-Che, J., de Bazelaire, C., Soufir, N., & Mongiat-Artus, P. (2010). Hereditary renal cancer syndromes: An update of a systematic review. *European Urology*, 58, 701–710.
- Vogelzang, N. J., Priest, E. R., & Borden, L. (1992). Spontaneous regression of histologically proved pulmonary metastases from renal cell carcinoma: A case with 5-year followup. *The Journal of Urology*, 148, 1247–1248.
- Wang, H., Wang, L., Liu, W.-J., Xia, Z.-J., Huang, H.-Q., Jiang, W.-Q., ... Lu, Y. (2016). High post-treatment serum levels of soluble programmed cell death ligand 1 predict early relapse and poor prognosis in extranodal NK/T cell lymphoma patients. *Oncotarget*, 7, 33035–33045.
- Wang, Q., Zhang, J., Tu, H., Liang, D., Chang, David. W., Ye, Y., & Wu, X. (2019). Soluble immune checkpoint-related proteins as predictors of tumor recurrence, survival, and T cell phenotypes in clear cell renal cell carcinoma patients. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 7, 334.
- Wehle, M. J., Thiel, D. D., Petrou, S. P., Young, P. R., Frank, I., & Karststadt, N. (2004). Conservative management of incidental contrast-enhancing renal masses as safe alternative to invasive therapy. *Urology*, 64, 49–52.
- Wherry, E. J., & Kurachi, M. (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature Reviews Immunology*, 15, 486–499.
- Wiesener, M. S., Münchenhagen, P. M., Berger, I., Morgan, N. V., Roigas, J., Schwiertz, A., ... Eckardt, K. U. (2001). Constitutive activation of hypoxia-inducible genes related to overexpression of hypoxia-inducible factor-1alpha in clear cell renal carcinomas. *Cancer Research*, 61, 5215–5222.

- Wiklund, F., Tretli, S., Choueiri, T. K., Signoretti, S., Fall, K., & Adami, H.-O. (2009). Risk of Bilateral Renal Cell Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 3737–3741.
- Wolf, J. (2012, Juli 27). Nierenzellkarzinom | el-IPH · Lehrtexte Spezielle Pathologie. Abgerufen 9. Januar 2021, von Nierenzellkarzinom | Lehrtexte Spezielle Pathologie Universität Heidelberg website: https://eliph.klinikum.uni-heidelberg.de/texte_s/555/nierenzellkarzinom
- Wu, A. M., Gallo, R. C. (1975). Reverse Transcriptase. *Critical Reviews in Biochemistry*, 3, 289-347.
- Wu, Y., Chen, W., Xu, Z. P., & Gu, W. (2019). PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy—Blockade, Knockdown, or Inhibition. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02022>
- Wu, Z., Li, M., Liu, B., Cai, C., Ye, H., Lv, C., ... Wang, L. (2014). Robotic versus Open Partial Nephrectomy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, 9, e94878.
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124, 471–484.
- Xu, F., Xu, L., Wang, Q., An, G., Feng, G., & Liu, F. (2015). Clinicopathological and prognostic value of programmed death ligand-1 (PD-L1) in renal cell carcinoma: A meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8, 14595–14603.
- Yagoda, A., Petrylak, D., & Thompson, S. (1993). Cytotoxic chemotherapy for advanced renal cell carcinoma. *The Urologic Clinics of North America*, 20, 303–321.
- Yee, D., Shah, K. M., Coles, M. C., Sharp, T. V., & Lagos, D. (2017). MicroRNA-155 induction via TNF- α and IFN- γ suppresses expression of programmed death ligand-1 (PD-L1) in human primary cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 292, 20683–20693.
- Yip, S., Wells, C., Moreira, R. B., Wong, A., Srinivas, S., Beuselinck, B., ... Heng, D. Y. C. (2017). Real world experience of immuno-oncology agents in metastatic renal cell carcinoma: Results from the IMDC. *Journal of Clinical Oncology*, 35, 492–492.
- Zaretsky, J. M., Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., ... Ribas, A. (2016). Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 375, 819–829.
- Zbar, B., Klausner, R., & Linehan, W. M. (2003). Studying Cancer Families to Identify Kidney Cancer

Genes. *Annual Review of Medicine*, 54, 217–233.

Zbar, B., Tory, K., Merino, M., Schmidt, L., Glenn, G., Choyke, P., ... Linehan, W. M. (1994). Hereditary Papillary Renal Cell Carcinoma. *The Journal of Urology*, 151, 561–566.

Zhu, X., & Lang, J. (2017). Soluble PD-1 and PD-L1: Predictive and prognostic significance in cancer. *Oncotarget*, 8, 97671–97682.

Zisman, A., Pantuck, A. J., Dorey, F., Said, J. W., Shvarts, O., Quintana, D., ... Belldegrun, A. S. (2001). Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19, 1649–1657.

9. Abkürzungsverzeichnis

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase
APCP	adenomatosis polyposis coli protein
APC	antigen presenting cell
ASPSR1	alveolar soft part sarcoma chromosome region 1
ASK1	apoptosis signal regulating kinase 1
Axin	axis inhibition protein
BAP1	breast-cancer antigen 1 associated protein 1
BCA	bicinchonin acid
BMI	body mass index
BHDS	Birt-Hogg-Dubé-Syndrom
BSA	bovine serum albumin
CA-IX	Carboanhydrase 9
ccRCC	clear cell renal cell carcinoma
CRP	C-reaktives Protein
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CK1	casein kinase 1
CKLF	Chemokine-Like factor super family
c-MET	cellular N-methyl-N'-nitroso-guanidine human osteosarcoma transforming gene
CMTM4	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing protein 4
CMTM6	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing protein 6
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
Ct	Cycle threshold
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
DC	dendritic cell
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Erk	extracellular-signal regulated kinases
FASN	fatty acid synthase

FBS	fetales bovines Serum
FGFR1	fibroblast growth factor receptor-1
FLT3	fms like tyrosine kinase 3
Gab1	Grb2-assciated-binding protein 1
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GSEA	gene set enrichment analysis
GSK-3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
GTP	Guanosintriphosphat
HCC	hepatocellular carcinoma
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	hypoxia inducible factor
ICB	Immunchekpoint-Blockade
IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
irAE	immune-related adverse event
IMDC	International Metastatic RCC Database Consortium
IRF1	interferon regulatory factor 1
Jade-1	gene for apoptosis and differentiation in epithelia
JAK	Janus kinase
LDH	Laktatdehydrogenase
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
LOH	loss of heterozygosity
LRRK2	leucin-rich repeat kinase 2
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MC	melting curve
MEK	MAP/Erk-Kinase
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MMPI	Matrix-Metalloproteinase-Inhibitor
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	Magnetresonanztomographie
MSKCC	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center
mTOR	mammalian target of rapamycin
MYC	Myelocytomatose

NRF2-ARE	nuclear factor erythroid 2 - related factor 2 - antioxidant response element
NSCLC	non-small cell lung cancer
ORR	objective response rate
OS	overall survival
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PBRM1	protein polybromo 1
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD-1	programmed death 1
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
PK1	phosphoinositide-dependent kinase 1
PD-L1	programmed death ligand 1
PD-L2	programmed death ligand 2
PFS	progression free survival
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
P-JAK	Phospho-JAK
pRCC	papillary renal cell carcinoma
PRKCE	protein kinase C epsilon
PTEN	phosphatase and Tensin homolog
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
RCC	renal cell carcinoma
RIPA	radioimmunoprecipitation assay
RNA	ribonucleic acid
RPM	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rT	reverse Transkriptase
RTK	Rezeptortyrosinkinase
rt-PCR	real-time polymerase chain reaction
RR	relatives Risiko
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel eletrophoresis
siRNA	small-interfering ribonucleic acid
SOS	son of sevenless
sPD-L1	lösliches (serum/soluble) PD-L1
STAT	signal transducer and activator of transcription

SWI/SWF	switch/sucrose nonfermentable chromatin remodeling complex
Taq	Thermus aquaticus
TBST	TRIS-buffered saline with Tween20
TBP	TATA-binding protein
TCF7	T-cell specific transcription factor 7
TCR	T-cell-receptor
TFE3	Transkriptionsfaktor E3
TGS	TRIS, Glycin, SDS
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TNF- α	tumor necrosis factor α
TNM	tumor, node, metastasis
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex 2
TT	targeted therapy
UICC	Union for international cancer control
UISS	University of California, Los Angeles integrated staging system
US	Ultraschall
UMPP	ubiquitin-mediated proteolysis pathway
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VHL	von-Hippel-Lindau
Wnt	wingless int-1
ZNS	zentrales Nervensystem

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: 5-Jahresmortalität in Bezug auf das Krankheitsstadium bei Diagnosestellung in den USA 2010-2016 (National Cancer Institute, 2016)	11
Abbildung 2: Krankheitsstadium bei Diagnosestellung in den USA 2010-2016 (National Cancer Institute, 2016).....	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung ausgewählter Signalwege und zielgerichteter Therapien beim RCC (Banumathy & Cairns, 2010).....	17
Abbildung 4: Krebs-Immunitäts-Zyklus (Chen, D. S. & Mellman, 2013).....	21
Abbildung 5: Stimulatorische und inhibitorische Faktoren im Krebs-Immunitäts-Zyklus (Chen, D. S. & Mellman, 2013)	22
Abbildung 6: Adaptive PD-L1-Expression in Reaktion auf tumorspezifische T-Zell-Antwort (Kalbasi & Ribas, 2020)	24
Abbildung 7: mRNA-Spiegel (Δ Ct) für PD-L1, PD-L2, CXCL10, JAK1, JAK2, STAT1, IRF1, IFN- γ R1, IFN- γ R2 in Kontrollzellen und mit IFN- γ behandelten Zellen (Hänze et al., 2020)	65
Abbildung 8: Western-Blot Analyse von Kontrollzellen und mit IFN- γ behandelten Zellen mit Antikörpern für PD-L1, PD-L2, p-JAK2, JAK2, p-JAK1, JAK1, IRF1 und zytoplasmatisches β -Actin (Hänze et al., 2020)	66
Abbildung 9: Effekt der Transfektion von PD-L1-siRNA bei CaKi-1-Zellen vor und nach Induktion von PD-L1 durch die Zugabe von IFN- γ und IL-2 A) auf Proteinebene im Western Blot. B) auf sPD-L1 (pg/ml) aus Zellkulturüberständen	67
Abbildung 10: Vergleich zwischen CaKi-1- und CaKi-2-Zellen hinsichtlich ihrer IL-2- und IFN- γ -abhängigen Induktion von PD-L1 und PD-L2. A) Proteinnachweis im Western Blot; B) Nachweis von sPD-L1 (pg/ml) aus Zellkulturüberständen	68
Abbildung 11: Nachweis von sPD-L1 und CRP prä- und post-Tumorresektion	70
Abbildung 12: Korrelation zwischen sPD-L1 und CRP und zwischen sPD-L1 und PD-L1-mRNA....	70
Abbildung 13: PD-L1 bei CaKi-1- und bei HepG ₂ -Zellen nach Zugabe von IL-6 und IFN- γ . A) Proteinnachweis im Western Blot; B) PD-L1-mRNA in der rt-PCR; C) Nachweis von sPD-L1 (pg/ml) aus Zellkulturüberständen	72

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mit dem RCC assoziierte vererbare Erkrankungen (Rübben, 2014).....	13
Tabelle 2: Histologische Subtypen des RCC und ihre Kennzeichen (Störkel et al., 1997; Wolf, 2012) 14	
Tabelle 3: Stadieneinteilung nach UICC, 2017 (Rini et al., 2017).....	27
Tabelle 4: Motzer-/MSKCC-Score (Motzer et al., 1999).....	28
Tabelle 5: Prognosegruppen nach Motzer (Motzer et al., 1999).....	28
Tabelle 6: IMDC-Risikomodell beim metastasierten RCC (Heng et al., 2009).....	29
Tabelle 7: Risikogruppen nach IMDC (Heng et al., 2013)	29
Tabelle 8: Geräte und Zubehör.....	42
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien.....	43
Tabelle 10: Zelllinien, Medium und Antibiotika.....	44
Tabelle 11: PCR-Primer	44
Tabelle 12: Antikörper für Western Blot.....	45
Tabelle 13: siRNAs	45
Tabelle 14: Puffer und Lösungen	46
Tabelle 15: Kits und Fertigsysteme	47
Tabelle 16: Chemikalien	47
Tabelle 17: Software	48
Tabelle 18: Verwendete Zelllinien	49
Tabelle 19: Ablaufschema PCR	56
Tabelle 20: Alters- und Geschlechterverteilung der eingeschlossenen Patienten	62
Tabelle 21: sPD-L1 und CRP prä- vs. post-Tumorresektion.....	69

12. Anhang

I. Lebenslauf

II. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren

In der Vorklinik:

Adamkiewicz, Baranovski, Baum, Becker, Bertoune, Bette, Bohlander, Brehm, Cetin, Decher, Feuser, Grundmann, Kinscherf, Koolmann, Lill, Mandrek, Mueller, Mutters, Neumüller, Oliver, Preisig- Müller, Quint, Sahmland, Schäfer, Schütz, Seitz, Stahl, Steiniger, Thieme, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wrocklage

In der Klinik:

Adarkwah, Albers, Arhelger, Baum, Bäumlein, Bartsch, Becker, Berger, Birk, Bliemel, Bösner, Bücking, Burchert, Carl, Cassebaum, Czubayko, Dettmeyer, Dodel, Donner-Banzhoff, Duda, Eberhardt, Eggert, Ehlenz, Eickmann, Ermisch, Fuchs-Winkelmann, Franz, Frink, Fritz, Geks, Geraedts, Gousias, Grgic, Hegele, Hemmeter, Hertl, Hoch, Hofmann, Hoß, Hoyer, Hundt, Irsusi, Jansen, Jaques, Jerrentrup, Kalder, Kann, Kanngießer, Kircher, Kirschbaum, Klose, Kluge, Knake, Knipper, Knöppel, Koehler, Köhler, Kolb-Niemann, Kortus-Götze, Kühnert, Kruse, Leonhardt, Lohoff, Lübbe, Luster, Maier, Maier, Maisner, Menzler, Metzelder, Mirow, Moll, Neubauer, Neubert, Nimsky, Nockher, Oberkircher, Oertel, Pagenstecher, Pankuweit, Pehl, Peterlein, Pfaar, Pfeiffer, Pfestroff, Pfützner, Plant, Printz, Reese, Renz, Richter, Riße, Roeßler, Rose, Röttgers, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schlößler, Schneider, Schreinert, Schu, Schulze, Schüttler, Schröder, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Stula, Tackenberg, Thiemer, Vogel, Völlger, Wagner, Walter, Westhoff, Wittig, Worzfeld, Wulff, Zavorotnyy, Zeisberger, Ziller, Zink, Ziring, Zwiorek

III. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die durch ihre Unterstützung zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation beigetragen haben.

Zuerst gilt mein Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jörg Hänze für die Überlassung des hochinteressanten Themas und für die zu jeder Zeit herausragende Betreuung. Lieber Jörg, vielen Dank für die umfangreiche Unterstützung, Deine Diskussionsbereitschaft und die vielen langen Telefonate! Wann immer ich ihn brauchte, konnte ich auf Deinen Rat bauen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rainer Hoffmann danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Klinik für Urologie und Kinderurologie anfertigen zu können. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Axel Hegele für die Bereitschaft danken, diese Dissertation zu unterstützen.

Ich bedanke mich bei dem gesamten Ärzteteam der Klinik für Urologie und bei Frau Heike Priebe für die Unterstützung bei der Sammlung der Proben.

Besonders danken möchte ich weiterhin Frau Susanne Lingelbach für ihre stets geduldige und zukommende Art bei der Vermittlung von Kenntnissen und Techniken der Laborarbeit und für die vielen gemeinsam verbrachten Stunden. Liebe Susanne, ohne Dich wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Weiterhin danke ich Frau Ecaterina Oplesch und allen Doktoranden des molekularbiologischen Labors der Klinik für Urologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Unterstützung in vielen Fragen.

Zutiefst danke ich allen meinen Freunden, meiner Familie und insbesondere meinen Eltern. Sie haben mich in jeder Lebenslage unterstützt und stehen immer hinter mir. Eure Unterstützung ist mit nichts aufzuwiegen.

Der größte Dank gebührt meiner Ehefrau Katja. Ich danke Dir von ganzem Herzen für Deine Geduld und Deine Zuversicht. Von Beginn dieses Promotionsvorhabens an hast Du während zahlreicher Stunden im Labor und am Schreibtisch auf mich verzichtet. Nach wie vor begleitest Du mich bedingungslos bei jedem meiner Vorhaben und bist mir dabei Ruhe, Kraft, Motivation, Konzentration und Ablenkung in einem. Dich in meinem Leben zu haben ist mein größtes Glück.

IV. Ehrenwörtliche Erklärung